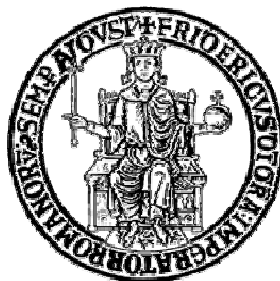


Università degli Studi di Napoli

“Federico II”



Dipartimento di agraria

Dottorato internazionale di ricerca in

INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

XXVIII ciclo

Tesi di dottorato

“Immunità, stress e salute delle api”

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Relatore

Chiar.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Candidata

Rosalba FERRARA

Anno Accademico 2015 - 2016

INDICE

ABSTRACT	6
RIASSUNTO.....	10
 INTRODUZIONE.....	 14
CAPITOLO I: L’APE E I SUOI NEMICI	15
1.1 La biologia delle api	16
1.2 La dieta delle api	17
1.3 Il valore delle api.....	18
1.4 Il declino delle api	19
1.5 Perdite di colonie e Colony Collaps Disorder.....	20
1.6 Le possibili cause della morte delle api.....	21
1.6.1 Parassiti e patogeni.....	22
1.6.1.1 <i>Varroa destructor</i>	22
1.6.1.2 I batteri.....	26
1.6.1.3 I funghi.....	27
1.6.1.4 I virus	28
1.6.1.4.1 Black Queen Cell Virus (BQCV).....	29
1.6.1.4.2 Sacbrood Virus (SBV).....	29
1.6.1.4.3 Kashmir Bee Virus (KBV)	30
1.6.1.4.4 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)	30
1.6.1.4.5 Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)	31
1.6.1.4.6 Deformed Wing Virus (DWV)	32
1.6.2 Relazione DWV-Varroa.....	34
1.6.3 Gli insetticidi: i neonicotinoidi	36
1.6.4 Gli stress alimentari.....	40
1.7 Scopo della tesi.....	43

CAPITOLO II: L'IMMUNITA'	46
2.1 L'immunità sociale	47
2.2 Le barriere fisiche	48
2.3 L'immunità cellulare	50
2.3.1 La fagocitosi	52
2.3.2 L'incapsulamento e la nodulazione.....	53
2.4 L'immunità umorale	55
2.4.1 La produzione dei ROS	55
2.4.2 Le cascate enzimatiche.....	56
2.4.2.1 La coagulazione.....	56
2.4.2.2 La melanizzazione	57
2.4.3 I peptidi antimicrobici	58
2.4.4 L'immuno-attivazione	60
2.4.5 Il pathway Toll.....	61
2.4.6 Il pathway Imd	62
2.4.7 Il pathway JAK/STAT	64
2.5 L'RNA interference.....	65
 PARTE SPERIMENTALE	67
 CAPITOLO III: DWV E VARROA	68
 CAPITOLO IV: NUTRIZIONE	82
4.1 INTRODUZIONE	83
4.2 MATERIALI E METODI.....	84
4.2.1 Materiale biologico	84
5.2.2 Preparazione della dieta.....	84
4.2.3 Trattamento con imidacloprid.....	85

4.2.4 Preparazione dei campioni	85
4.2.5 Valutazione del tasso di sopravvivenza	86
4.2.6 Valutazione del consumo di dieta	86
4.2.7 Intake target	87
4.2.8 Valutazione dei livelli di DWV	87
4.2.8.1 Estrazione RNA.....	88
4.2.8.2 Trattamento con DNasi I.....	89
4.2.8.3 qPCR.....	89
4.2.8.3.1 Disegno dei primer	90
4.2.8.3.2 qRT-PCR	90
4.2.8.3.3 Quantificazione assoluta.....	92
4.2.9 Analisi statistica	93
4.3 RISULTATI.....	93
4.3.1 Valutazione del tasso di sopravvivenza	93
4.3.2 Valutazione del consumo di dieta.....	96
4.3.3 Valutazione dei livelli di DWV	101
4.3 DISCUSSIONE.....	104

CAPITOLO V: I NEONICOTINOIDI108

5.1 INTRODUZIONE	109
5.2 MATERIALI E METODI.....	110
5.2.1 Valutazione degli effetti del CLT su api adulte.....	110
5.2.1.1 Materiale biologico.....	110
5.2.1.2 Preparazione dei campioni	111
5.2.1.3 Test di incapsulamento e melanizzazione.....	111
5.2.2 Esperimenti <i>in vitro</i> su culture cellulari umane	112
5.2.2.1 Colture cellulari	112

5.2.2.2 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione genica delle cellule THP-1	113
5.2.2.2.1 Trattamento con CLT	113
5.2.2.2.2 Estrazione RNA e trattamento con DNasi.....	113
5.2.2.2.3 RNA Seq	114
5.2.2.2.4 Predizione bioinformatica (Gene Ontology).....	114
5.2.2.2.5 Verifica dei risultati dell'RNA-Seq.....	114
5.2.2.2.6 Retrotrascrizione	115
5.2.2.2.7 Scelta delle sonde	116
5.2.2.2.8 qPCR.....	117
5.2.2.2.9 Quantificazione relativa.....	118
5.2.3 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione di TNF α	118
5.2.4 Valutazione degli effetti del CLT sull'attivazione del fattore di trascrizione NK- κ B	119
5.2.4.1 Trasfezione delle cellule THP-1 con il reporter per NF- κ B.....	119
5.2.4.2 Test della luciferasi.....	119
5.2.5 Analisi statistica	120
5.3 RISULTATI	120
5.3.1 Valutazione degli effetti del CLT su api adulte.....	120
5.3.2 Esperimenti <i>in vitro</i> su culture cellulari umane	123
5.3.2.1 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione genica delle cellule THP-1	123
5.3.2.2 Verifica dei dati di espressione di alcuni geni selezionati	131
5.3.2.3 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione di TNF α	133
5.3.2.4 Valutazione degli effetti del CLT sull'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B	134
5.3 DISCUSSIONE.....	135

CONCLUSIONI.....	139
BIBLIOGRAFIA	141
RINGRAZIAMENTI.....	176

ABSTRACT

Insect pollinators provide a fundamental ecological service, which is essential both for agricultural production and for protecting plant biodiversity, largely depending upon pollination. The species *Apis mellifera* L. is the most studied species owing to its ecological and industrial relevance.

In the last decade, the widespread losses of honeybee colonies have attracted the attention of the scientific community and of the public opinion due to their economic and ecological impact. This phenomenon has been studied from different perspectives, but, so far, a single causal agent has not been identified. There is a general consensus on the hypothesis that this is a multifactorial syndrome, induced by different synergistic stress factors.

This thesis focuses on the main stress agents identified so far, such as *Varroa destructor* in association with the Deformed Wing Virus (DWV), nutrition and neonicotinoids, which are able to induce honeybee health decline and are often associated with colony losses.

The *Varroa*/DWV association is reported as one of the most frequent conditions observed in collapsing colonies. The mite is an active vector of this viral pathogen, which when undergoes replication and exceeds a critical threshold produces symptomatic infections associated with increasing levels of immunosuppression and health decline. Here we have characterized at functional level the negative impact of DWV on honeybee immune response, describing the effects of viral infection both on humoral and cellular components of the defense barriers and on the expression profile of the major genes underlying their regulation. This study has allowed to assess the effects of host immunosuppression by viral infection on *Varroa* fitness. Indeed, this latter is significantly enhanced by mite feeding on DWV infected honeybees which contain haemolymph with a higher nutritional suitability due to the reduced immunocompetence. Therefore the viral pathogen exerts a positive influence on mite nutrition and, as a consequence, enhances its reproductive rate. These results demonstrate the occurrence of a mutualistic symbiosis between *Varroa* and DWV which largely accounts for the pivotal importance of this association in the induction of honeybee colony collapse.

The second research theme addressed by this thesis work focuses on the complex network of interactions underlying the cross-modulation between metabolism and immunity. Nutrition is essential to support the immune defences and the resistance against pathogens and, as such, has a direct impact on general health and reproductive success of animals. Indeed, nutritional stress in honeybees can influence the immune response and trigger uncontrolled pathogen proliferation. Here we have studied how the use of nutritionally unbalanced diets can influence immunocompetence as a consequence of an induced metabolic change. In particular, we have focused our attention on the effects on honeybee health associated with diets containing different levels of essential amino acids (EAA). We have observed that an excess of EAA in the diet affects the feeding behavior and results in higher mortality rates. These unbalanced diets have an influence also on the honeybee capacity to respond to additional stress factors, such as the chronic exposure to sub-lethal doses of neonicotinoids. The exposure to this insecticide alters the honeybee feeding behavior, inducing a higher food intake, and enhances the negative impact of unbalanced diets rich in EAA. The registered higher mortality is associated with a reduced immunocompetence, as measured by the increased DWV titer. This indicates that the nutritional conditions used, likely promoting metabolic activation, negatively modulate immunity and synergistically interact with immunosuppressive insecticides, such as neonicotinoids.

The third research issue focuses on the action of neonicotinoids on the immune system. These insecticides can contribute to the health decline of honeybees by reducing the immune barriers under NF- κ B control and in particular the antiviral responses modulated by the Toll pathway. In this section, we provide new experimental evidence corroborating this working hypothesis. Indeed, cellular and humoral components of the honeybee immune response under NF- κ B control are negatively influenced by exposure to neonicotinoids. Because these immune pathways are highly conserved in the animal kingdom, we wanted to assess if these immunosuppressive effects occur also on higher animals. To this aim, we have used a human monocytic cell line (THP-1) to assess the possible effect of clothianidin on the immune response of mammals. The results gathered so far show that exposure to clothianidin negatively alter the expression profile of genes under NF- κ B control. This suggests that this insecticide can induce

immunosuppressive effects on mammals similar to those observed in insects. However, additional studies at the organism level are necessary to confirm this hypothesis.

RIASSUNTO

Gli insetti impollinatori offrono un servizio ecologico di fondamentale importanza sia per la produzione agricola che per il mantenimento della biodiversità vegetale, largamente dipendenti dall'azione pronuba di questi insetti. Fra questi, l'ape (*Apis mellifera* L.) è certamente quella più studiata per ovvi motivi associati alla sua rilevanza ecologica e produttiva.

Nel corso degli ultimi dieci anni le diffuse perdite di colonie d'api hanno attirato l'attenzione del mondo scientifico e dell'opinione pubblica, visto il loro valore economico ed ecologico. Questo fenomeno è stato studiato da diverse prospettive, ma, ad oggi, non è stato associato ad uno specifico agente causale. Tuttavia vi è un ampio consenso circa l'ipotesi che ciò sia imputabile a una sindrome multifattoriale indotta da diversi agenti di stress che possono agire in modo sinergico.

Il presente lavoro di tesi si concentra sui principali agenti di stress, *Varroa destructor* in associazione con il virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus – DWV), nutrizione e neonicotinoidi, in grado di indurre fenomeni di declino dello stato di salute delle api e variamente associati a fenomeni di collasso.

L'associazione *Varroa*/DWV è ampiamente riportata come una delle condizioni più frequentemente associata a perdite di colonie di api. L'acaro agisce da vettore di questo virus patogeno che, quando raggiunge una soglia critica, passa dallo stato di infezione asintomatica a quella conclamata con crescente compromissione dello stato di salute delle api caratterizzata da una evidente condizione di ridotta competenza immunitaria. In questo lavoro di tesi è stato svolto uno studio funzionale dell'impatto del DWV sulla risposta immunitaria dell'ape che descrive gli effetti dell'infezione virale sulla componente umorale e cellulare delle barriere di difesa e sull'espressione dei principali geni che le regolano. Questo studio ha reso possibile la valutazione dell'effetto che l'immunosoppressione dell'ospite, indotta dall'infezione virale, può avere sulla fitness della *Varroa*. Infatti, quest'ultima è significativamente più elevata allorquando l'attività di alimentazione avviene su api infette da DWV come possibile conseguenza del fatto che l'emolinfa risulta più fruibile in presenza di una ridotta competenza immunitaria dell'ape. Pertanto, il patogeno virale esercita un'influenza positiva sull'alimentazione dell'acaro e, di conseguenza, sul suo tasso di riproduzione. Questi risultati mostrano l'esistenza di una simbiosi mutualistica tra *Varroa* e

DWV che spiega e giustifica la sua notevole importanza nell'induzione del collasso delle colonie d'api.

Il secondo tema di ricerca riportato in questo lavoro di tesi ha fornito nuove informazioni circa la complessa interazione che esiste tra metabolismo e immunità. La nutrizione è fondamentale per la difesa immunitaria e la resistenza agli agenti patogeni, con conseguenze che riguardano il benessere e il successo riproduttivo dei singoli organismi. Condizioni di stress nutrizionale possono modificare la risposta immunitaria, tanto da poter indurre una proliferazione incontrollata degli agenti patogeni nelle api. Abbiamo studiato gli effetti di diete sbilanciate sulle api al fine di comprendere come l'immunocompetenza sia metabolicamente controllata. In particolare, abbiamo stimato gli effetti dell'esposizione a diete con diversa concentrazione di aminoacidi essenziali (AE) sullo stato di salute delle api. Abbiamo constatato come un'alta concentrazione di AE nella dieta influenzi l'assunzione di cibo e riduca la durata della vita delle api. Diete squilibrate influenzano la capacità delle api nel rispondere ad altri fattori di stress quale, ad esempio, l'esposizione cronica a dosi sub-letali di neonicotinoidi. In particolare, l'esposizione all'insetticida altera il comportamento alimentare dell'ape, che assume più cibo, e induce un aumento del tasso di mortalità. L'incremento di mortalità associato all'assunzione di diete sbilanciate, registrato in maggior misura in presenza di imidacloprid, risulta positivamente associato ad una ridotta competenza immunitaria delle api. Infatti, queste condizioni sperimentali di stress alimentare, con un eccesso di aminoacidi in grado di promuovere attivazione metabolica a livello cellulare, hanno fatto registrare un più alto livello di replicazione del DWV, che potrebbe aver contribuito alla ridotta sopravvivenza osservata.

Infine, il terzo tema di ricerca affrontato in questo lavoro ha riguardato lo studio dell'azione dei neonicotinoidi sul sistema immunitario. Questi insetticidi possono contribuire al declino delle condizioni di salute delle api, riducendo il livello delle difese immunitarie sotto il controllo del fattore trascrizionale NF- κ B e in particolare le barriere antivirali sotto il controllo del pathway Toll. In questa parte della tesi forniamo ulteriori prove che corroborano questa ipotesi. In particolare si dimostra come l'esposizione ai neonicotinoidi influenzi negativamente anche altri componenti della difesa immunitaria delle api, sia umorali che cellulari,

controllate da NF- κ B. Poiché questi meccanismi di controllo delle difese immunitarie innate sono molto conservati nel mondo animale, si è deciso di valutare se i neonicotinoidi possano avere effetti immunosoppressivi analoghi su animali superiori. Al fine di studiare il possibile effetto del clothianidin sul sistema immunitario dei mammiferi abbiamo condotto studi su una linea cellulare monocitica umana (THP-1). Dai nostri risultati emerge che il clothianidin è in grado di modificare l'espressione genica delle cellule influenzando l'espressione dei geni sotto il controllo di NF- κ B. Ciò suggerisce che questo pesticida può produrre effetti sui mammiferi simili a quelli osservati negli insetti. Tuttavia sono necessari ulteriori studi a livello di organismo per confermare questa ipotesi.

INTRODUZIONE

CAPITOLO I: L'APE E I SUOI NEMICI

Fin dall'antichità le api sono state allevate dall'uomo assumendo nel tempo un ruolo sempre più rilevante per la sua sopravvivenza. Tra queste l' *Apis mellifera* ha un ruolo fondamentale non solo per i suoi prodotti ma, soprattutto, per l'insostituibile ruolo d'insetto impollinatore. L'ape, inoltre, rappresenta il fulcro di un'intensa ricerca in quanto funge da organismo modello per lo studio di diversi aspetti biologici quali, ad esempio, il comportamento, l'immunità, le reazioni allergiche o lo sviluppo; il sequenziamento del suo genoma, avvenuto nel 2006, ha aperto la strada ad una moltitudine di nuove possibilità di ricerca. Non sorprende, quindi, l'attenzione che nell'ultimo decennio è stata data al problema del collasso delle colonie e alla ricerca dei fattori che possono determinarlo.

1.1 La biologia delle api

Le api sono insetti appartenenti all'ordine *Hymenoptera*, famiglia *Apidae*, e ad oggi sono state descritte circa 5700 specie. Il genere *Apis* comprende numerose specie (quelle più note sono l'*A. florea*, *A. dorsata*, *A. cerana* e *A. mellifera*) ma quella più comunemente allevata dall'uomo è l'*Apis mellifera*, in particolare la sottospecie *ligustica*, in quanto facile da gestire, prolifera e con una minore tendenza a sciamare delle altre. L'*A. mellifera*, descritta per la prima volta da Linnaeus nel 1758, vive all'interno di colonie costituite da 60.000-80.000 individui nel quale generalmente possiamo riconoscere un'ape regina fertile, poche centinaia di maschi fertili, i fuchi, e migliaia di api operaie sterili (Winston, 1991). La regina può deporre circa 2000 uova al giorno e la colonia può aumentare da poche migliaia a decine di migliaia di api in diverse settimane (Tautz, 2008). La regina si accoppia con i fuchi una sola volta ed è in grado di immagazzinare tutto lo sperma nella spermateca per tutta la sua vita, che in genere è di circa 3-4 anni. I fuchi e le api operaie nel pieno della loro attività hanno una durata di vita di circa 6 settimane, fatta eccezione nei periodi di svernamento, in cui le api operaie possono sopravvivere fino a 8 mesi. La determinazione del sesso nelle api segue il sistema aplodiploide, piuttosto comune negli insetti dell'ordine degli *Hymenoptera*, dove i maschi sono aploidi e le femmine diploidi

(Heimpeland de Boer, 2008). Tutte e tre le caste attraversano quattro fasi di sviluppo: uovo, larva, pupa e adulto. Tutte le fasi di vita, eccetto quella di adulto, si svolgono in celle di cera esagonali costruite all'interno del nido. Lo sviluppo di un'ape operaia richiede circa 21 giorni (per le regine bastano 15 giorni mentre i fuchi ne necessitano di 24). Il ciclo inizia quando una regina fertile depone un uovo nella cella preparata dalle api; dopo circa tre giorni schiude la larva che galleggia nella pappa reale secreta dalle api nutrici. Le larve crescono rapidamente nel corso dei successivi 6 giorni, aumentando il loro peso corporeo da 1500 a 1700 volte (Oliver, 2010). Intorno al sesto giorno ogni larva fila un bozzolo all'interno della cella e le api operaie coprono ogni cella con un rivestimento di cera. Questo è l'inizio dello stadio di pupa che dura circa 12 giorni (Kevan, 2007). Subito dopo lo sfarfallamento, le api operaie si dedicano ai loro compiti incominciando dalla pulizia delle celle in cui sono nate. Esse hanno organi riproduttivi atrofizzati e assolvono mansioni diverse in base all'età: le prime tre settimane di vita si svolgono nell'alveare, dove si dedicano a compiti quali la pulizia delle celle, la nutrizione della covata, la costruzione dei favi di cera, la conservazione delle scorte e la difesa della colonia; nel periodo successivo, le api operaie si occupano della raccolta degli elementi necessari al sostentamento dell'intera famiglia come il nettare, polline, propoli e acqua.

1.2 La dieta delle api

Per una corretta crescita e sviluppo della colonia le api richiedono una dieta bilanciata contenente carboidrati, proteine, lipidi, vitamine e acqua. La quantità e la qualità di cibo varia a seconda della casta e dello stadio di sviluppo. Le regine adulte sono alimentate dalle api nutrici, mentre le operaie e i fuchi hanno bisogno di provvedere al proprio nutrimento. Al contrario, tutte le larve vengono alimentate, quando necessario, dalle api operaie. Mentre le regine sono nutrite per quasi tutto lo stadio larvale mediante la pappa reale, secreta per il 60-80% dalla ghiandola ipofaringea e circa il 20-40% da quella mandibolare, le larve delle api operaie ricevono tale alimento solo nei primi giorni di vita (Sammataro e

Avitabile, 1998). In particolare lo sviluppo da larva ad ape operaia richiede circa 59,4 mg di carboidrati (Rortais *et al.*, 2005). La fonte naturale di carboidrati per le api è il nettare che viene raccolto dalle api foraggere, trasportato all'alveare e infine immagazzinato come miele nelle celle sigillate. La trasformazione da nettare a miele è graduale e comincia già durante il volo di ritorno (Nicolson e Human, 2008). Nella colonia il contenuto di acqua di questo è ridotto al 16-20% e vengono aggiunti enzimi, quali invertasi, diastasi e glucosio ossidasi, che spiegano la composizione di carboidrati del miele: in media 38% di fruttosio, 31% di glucosio e piccole percentuali di altri trisaccaridi (Doner, 1977).

Per quanto riguarda gli aminoacidi, quelli fondamentali per la salute delle api sono essenzialmente dieci, metionina, triptofano, arginina, lisina, istidina, fenilalanina, isoleucina, treonina, leucina e valina (De Groot, 1953), ed eventuali carenze di questi possono limitare lo sviluppo, la produttività e il mantenimento della colonia (Brodschneider e Crailsheim, 2010). L'unica fonte naturale di proteine per le api è il polline. Le colonie raccolgono dai 10 ai 26 kg di polline all'anno (Wille *et al.*, 1985). A differenza del miele, solo una piccola quantità di polline viene immagazzinato nella colonia per lunghi tempi e le scorte diminuiscono rapidamente durante i periodi di non foraggiamento (Schmickl e Crailsheim, 2002). Nella colonia le api mescolano il polline con il nettare rigurgitato, il miele e le secrezioni ghiandolari per produrre il cosiddetto pane delle api, che differisce dal polline appena raccolto per il più basso pH e la minore quantità di amido (Ellis e Hayes, 2009). Il polline funge anche da fonte di lipidi, importanti non solo per lo sviluppo della covata ma anche come fonte di steroli per la produzione e la regolazione degli ormoni della crescita nell'ape adulta (Huang, 2010).

1.3 Il valore delle api

Il settore apistico rappresenta oggi un trend in forte sviluppo visto il crescente interesse di mercato nei confronti di prodotti quali miele, cera, propoli, polline e pappa reale, impiegati non solo nel settore alimentare ma anche in quello

farmaceutico e cosmetico. Oltre al valore legato a tale produzione, ancor più rilevante è il ruolo che questi insetti svolgono come impollinatori. E' stato stimato che l'azione svolta dalle api e dagli altri impollinatori incrementi il rendimento, la qualità e la stabilità di circa il 75% delle più importanti monoculture e contribuisca alla produzione del 35% del cibo mondiale (Klein *et al.*, 2007). Nella sola Europa l'84% delle 264 principali colture dipendono direttamente dall'impollinazione entomofila e quella condotta dalle api garantisce la sopravvivenza di circa 4000 specie vegetali (Kluser e Peduzzi, 2007). Il team guidato da Winfree ha evidenziato come esistano differenti metodi per attribuire un valore economico all'azione impollinatrice degli animali in campo agricolo. Unendo i differenti metodi di analisi è stato sviluppato un accurato sistema che, ad esempio, ha stimato a 3 milioni di dollari il valore attribuibile all'azione impollinatrice delle api nella sola produzione di cocomeri in New Jersey e Pennsylvania (Winfree, 2011). Sebbene sia difficile quantificare in maniera precisa l'indotto economico collegato a questo servizio ecosistemico, secondo recenti studi nel 2009 negli USA esso è stato pari a 11,68 miliardi di dollari (Calderone, 2012), mentre a livello mondiale nel 2005 è stato stimato attorno ad un valore di 153 miliardi di euro (Gallai *et al.*, 2009). Praticamente inestimabile è invece il valore del contributo dell'azione impollinatrice delle api nel mantenimento dell'ecosistema terrestre, visto il vitale ruolo svolto nel garantire la biodiversità delle specie vegetali (Potts *et al.*, 2010). L'ape rappresenta, ad oggi, il più versatile tra gli insetti impollinatori, facile da allevare e trasportare, ed economico. Essa è vista, non a caso, come uno dei più importanti impollinatori, capaci di generare un efficiente servizio ecosistemico che, tra l'altro, contribuisce a migliorare lo stato di salute e di benessere dell'uomo.

1.4 Il declino delle api

Alla luce dell'importante ruolo che le api svolgono nell'impollinazione e nell'alimentazione dell'uomo, si comprende l'enorme attenzione che nell'ultimo decennio la comunità scientifica e non solo ha rivolto nei confronti dei fenomeni

d'improvvisa e massiccia perdita di colonie di api, registrate sia negli USA che in Europa (Neumann e Carreck, 2010). Ripercorrendo i registri storici si nota come periodiche ed estensive perdite di questo tipo non siano fenomeni inusuali, basti pensare alla "the great mortality of bees" di cui soffrì l'Irlanda nel 950, nel 992 e nel 1443 (Flemming, 1871). Uno dei casi più famosi e meglio documentati è la cosiddetta "Isle of Wight disease" del 1906, quando gli apicoltori della piccola isola a sud delle coste inglesi denunciarono la morte misteriosa di numerose colonie di api, descrivendo insetti che, colpiti da una sorta di paralisi, erano incapaci di volare (Moritz *et al.*, 2010). L'analisi dei registri storici suggerisce inoltre che durante il XX secolo, in alcuni Paesi europei, quali Regno Unito, Paesi Bassi e Belgio, vi sia stato un calo nella biodiversità dei bombi e delle altre api selvatiche, ma che questo calo sia diminuito dal 1990 (Carvalho *et al.*, 2013). A partire dal 1940, negli Stati Uniti il numero di colonie si è ridotto del 61% (Ellis *et al.*, 2010; VanEngelsdorp e Meixner, 2010), così come in Europa si è osservato un decremento del numero di arnie, che tra il 1970 e il 2007 sono passate da 21 a 15,5 milioni (FAO 2009; Aizen e Harder, 2009). Nell'ultimo decennio abbiamo però assistito ad una preoccupante impennata di questo trend negativo. Recenti stime evidenziano come negli Stati Uniti la perdita annuale di colonie è stata del 45% nel 2012-2013 (Steinhauer *et al.*, 2014) e del 34% nel 2013-2014 (Lee *et al.*, 2015), così come in alcuni Paesi europei, basti pensare all'Inghilterra e al Galles, nei quali la perdita invernale di colonie è stata di circa il 30% (van der Zee *et al.*, 2014).

1.5 Perdite di colonie e Colony Collaps Disorder

I primi casi di questa nuova emergenza per la salute delle api sono stati segnalati negli Stati Uniti nell'inverno del 2006/2007, quando furono riportati improvvisi e misteriosi episodi di collasso degli alveari che determinarono la perdita dal 30 al 90% di colonie di api statunitensi (vanEngelsdorp *et al.*, 2007). A quest'allarme seguirono altre segnalazioni di questo tipo, con perdite di api accomunate da sintomi differenti da quelli tipici delle arnie, che hanno permesso di definire una

vera e propria sindrome alla quale è stato dato il nome di “Colony Collaps Disorder” o CCD (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Spesso, però, la letteratura scientifica ha ingiustamente associato perdite di colonie, molto comuni e diffuse in tutto il mondo, alla CCD, benchè queste non presentassero i sintomi tipici di tale “malattia” (Ratnieks e Carreck, 2010). I sintomi più comuni che caratterizzano gli alveari colpiti da CCD sono (van der Zee *et al.*, 2013):

- ✓ rapida perdita delle api operaie;
- ✓ presenza di covata opercolata all’interno delle colonie;
- ✓ operaie molto giovani e presenza della regina;
- ✓ assenza di operaie morte all’interno o in prossimità delle colonie prossime al collasso, il che fa ipotizzare che la morte avvenga in campo;
- ✓ abbondanza di scorte di miele e polline all’interno delle colonie collassate non oggetto di saccheggio da parte delle colonie sane vicine;
- ✓ tardiva invasione dell’alveare collassato da parte di parassiti e intrusi (ad esempio *Aethina tumida* e *Galleria mellonella*);
- ✓ livelli bassi e non dannosi di *Varroa* e/o *Nosema*.

1.6 Le possibili cause della morte delle api

Numerosi sono gli studi volti a definire le ragioni del collasso delle colonie, anche se c’è un consenso generale sul fatto che questo non dipenda da un singolo fattore ma piuttosto da più fattori in grado di interagire tra loro.

Non a caso se chiedessimo ad un gruppo di apicoltori di individuare le ragioni della perdita delle proprie colonie, le cause riportate sarebbero numerose, andando dal fallimento della regina a carenze nutrizionali, dall’azione di parassiti (in particolare la *Varroa*) e patogeni degli alveari a uno stato di debolezza generale delle colonie legato, tra l’altro, all’uso dei pesticidi (vanEngelsdorp *et al.*, 2007, 2010, 2012; Spleen *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2014). Accanto a queste possibili cause sono state spesso affiancate ed enfatizzate spiegazioni che ad oggi

sembrano meno probabili, basti pensare all'influenza delle onde elettromagnetiche legate all'uso dei telefoni cellulari (Neumann e Carreck, 2010).

1.6.1 Parassiti e patogeni

I parassiti e patogeni rappresentano alcuni dei più importanti agenti di stress a cui sono esposte le api. In natura le api sono soggette all'attacco di un ampio spettro di parassiti e patogeni, inclusi protisti, funghi, batteri e virus.

1.6.1.1 *Varroa destructor*

Una delle più grandi minacce per l'apicoltura è rappresentata dall'acaro parassita *Varroa destructor* (Anderson e Trueman, 2000), che, non a caso, costituisce uno dei principali stress biotici su cui si è focalizzata la ricerca.

Il genere *Varroa* comprende 4 ectoparassiti obbligati: *V. jacobsoni* Oudemans, che fu descritta per la prima volta in Indonesia come acaro patogeno del suo ospite naturale, *A. cerana* (Oudemans, 1904), *V. underwoodi* descritta come parassita di *A. cerana* in Nepal (Delfinado-Baker e Aggarwal, 1987), *V. rindereri* associata ad *A. koschevnikovi* in Borneo (De Guzman e Delfinado-Baker, 1996) e *V. destructor*, descritta per la prima volta sul suo ospite originale, *A. cerana*, e in passato erroneamente classificata come *V. jacobsoni*, dal cui è stata poi distinta sulla base di studi morfologici e analisi del DNA mitocondriale (Anderson e Trueman, 2000). *V. destructor* non ha ricevuto una grande attenzione da parte del mondo scientifico fino a quando, in seguito all'introduzione dell'*A. mellifera* nell'Asia sud-orientale a fini produttivi, si è verificato il passaggio del parassita sul suo nuovo ospite, con conseguente diffusione in quasi tutto il mondo (Boecking e Genersch, 2008).

Da un punto di vista morfologico, la *Varroa* ha il corpo diviso in due parti, l'idiosoma e lo gnatosoma, ed è presente un marcato dimorfismo sessuale (Fig. 1.1). Le femmine, lunghe in media 1,1 mm e larghe 1,6 mm, mostrano una colorazione bruno-rossastra. Hanno un idiosoma appiattito ed ellissoidale e zampe corte e forti, con strutture specializzate per adesione all'ospite (gli apoteli) (De

Ruijter e Kaas, 1983). Tutto il corpo, comprese zampe e apparato boccale, è coperto da numerosi peli e alcuni di questi possiedono funzioni mecano- e chemorecettive (Milani e Nannelli, 1988). Il corpo maschile è a forma triangolare, di colore giallo, e mostra solo una debole sclerotizzazione. I maschi sono chiaramente più piccoli rispetto alle femmine in tutte le fasi di sviluppo e, in rapporto alla dimensione del corpo, hanno zampe più lunghe.



Figura 1.1 - Dimorfismo sessuale in *Varroa*. Appaiono palesi alcune delle differenze morfologiche tra la femmina (a sinistra) e il maschio (a destra) della *Varroa*, quali le diverse dimensioni e il diverso grado di sclerotizzazione dell'esoscheletro.

Il ciclo vitale della *Varroa* è strettamente associato a quello del suo ospite e comprende essenzialmente due fasi: una foretica, che la *Varroa* trascorre sulle api adulte, e una riproduttiva, che avviene nelle celle della covata (Fig. 1.2). Durante la fase foretica le femmine si localizzano soprattutto a livello degli sterniti addominali dell'ape, dove possono facilmente alimentarsi (Fernández *et al.*, 1993). E' stato osservato che le femmine di *Varroa* preferiscono le api nutrici a quelle foraggere, aumentando così la probabilità di essere trasportate nelle celle di covata nelle quali possono riprodursi (Kraus, 1993). La *Varroa* entra nelle celle delle api operaie 15/20 ore prima che siano sigillate (50/60 ore prima nel caso delle celle dei fuchi), in quanto attratta da sostanze volatili rilasciate dalle stesse larve (Nazzi e Le Conte, 2016). In particolare le celle dei fuchi sono maggiormente infestate rispetto a quelle delle api operaie, probabilmente anche perché le *Varroa* sembrano essere attratte da caïromoni rilasciati dai maschi (Calderone and Lin, 2001). Un altro fattore che contribuisce alla maggiore infestazione delle larve di fuco è il più intenso numero di visite delle celle di

questi da parte delle api nutrici, il che rende più probabile l'infestazione dei maschi che delle femmine (Calderone e Kuenen, 2003). Non solo la larva in se ma anche le sostanze semiochimiche contenute nelle celle e nel cibo delle larve possono avere un azione attrattiva sulle femmine di *Varroa* (Calderone e Lin, 2001; Nazzi *et al.* 2004). Ci sono però anche dei composti naturali che hanno un effetto repellente sulle femmine della *Varroa*. Nazzi e i suoi colleghi (Nazzi *et al.*, 2009) hanno ad esempio evidenziato che l'acido ottanoico, presente in quantità maggiori nella pappa reale piuttosto che nel cibo delle larve operaie o dei fuchi, ha un effetto repellente sulle femmine di *Varroa*, contribuendo a spiegare, almeno in parte, il basso tasso di infestazione delle celle delle regine. Dopo essere entrato nella cella contenente la larva, la femmina di *Varroa* si posiziona sul fondo, invischiandosi nel cibo larvale ed evitando così il rilevamento e la rimozione da parte delle api operaie. Dopo che la celletta è stata opercolata il parassita, e successivamente la sua progenie, si nutre dell'emolinfa dell'ospite attraverso un foro creato nel tegumento della pupa (Donzé e Guerin, 1994). Circa 60-70 ore dopo la chiusura della cella viene deposto il primo uovo, normalmente non fecondato, che porterà allo sviluppo di un maschio, visto l'aplodiploidia della *Varroa* (Ifantidis, 1983). A intervalli di 30 ore, la madre deporrà dalle 5 alle 6 uova fecondate, che porteranno allo sviluppo delle femmine (Martin, 1994). Il tempo che trascorre dalla deposizione dell'uovo alla formazione dell'adulto di *Varroa* è di circa 5,8 giorni per le femmine e 6,6 per i maschi e prevede il passaggio attraverso due fasi, quella di protoninfa e deutoninfa (Ifantidis, 1983). Quando l'ape sfarfalla, dopo circa 12 giorni per le operaie e 15 per i fuchi, vi è la fuoriuscita della *Varroa* madre e di una o due figlie mature a seconda dell'ospite (Schulz, 1984).

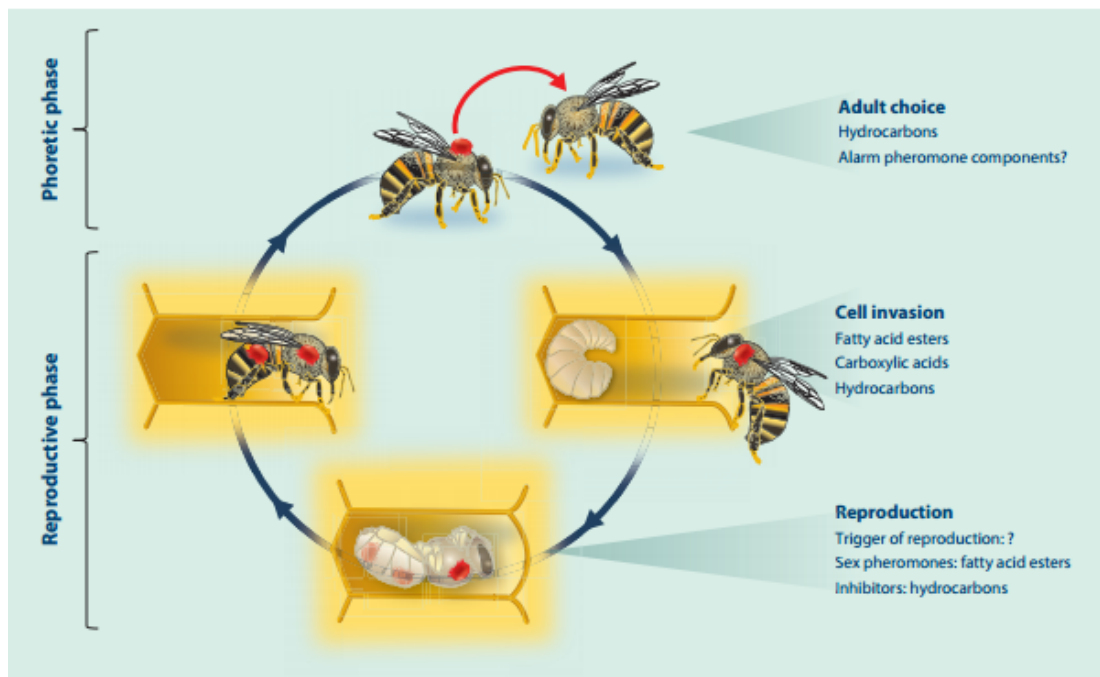


Figura 1.2 - Ciclo vitale della *Varroa*. Sia la fase foretica che quella riproduttiva possono essere mediate da diverse sostanze chimiche (Nazzi e Le Conte, 2016).

L'infestazione da *Varroa* è in grado di determinare una serie di effetti fisici e fisiologici non solo alla singola ape ma all'intera colonia. La perdita di emolinfa nelle api, durante lo sviluppo della *Varroa*, determina, ad esempio, una significativa riduzione del peso corporeo degli insetti parassitizzati. Tale perdita di peso sembra dipendere dal numero di acari-madre e dalla consistenza numerica della prole, sebbene anche la presenza di un singolo parassita determini un calo del peso dell'ape operaia di circa il 7% (De Jong *et al.*, 1982). Anche nei fuchi si osserva una riduzione del peso, in seguito ad infestazione da *Varroa*, che sembra essere correlata al numero di acari femmine che invadono la celletta della larva (Duay *et al.*, 2003). E' stato inoltre osservato che i fuchi parassitizzati da una singola *Varroa* hanno una riduzione nelle loro prestazioni di volo, e tale riduzione è maggiore se aumentano il numero di acari che parassitizzano (Duay *et al.*, 2002). Le api operaie parassitizzate durante il loro sviluppo passano precocemente da nutrici a foraggiere e presentano una riduzione della loro aspettativa di vita (Amdam *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 1982). Le foraggiere parassitizzate mostrano, inoltre, una riduzione nell'apprendimento non associativo (Kralj *et al.*, 2007) e una minore capacità di ritornare all'alveare (Kralj e Fuchs, 2006).

Eppure gli effetti più devastanti legati all'infestazione da *Varroa* non dipendono direttamente dall'acaro ma dai numerosi virus delle api di cui è vettore. Prima della diffusione della *Varroa*, infatti, le patologie legate alla presenza dei virus erano considerate un problema di poco conto per la salute delle api (Yue e Genersch, 2005). Con il propagarsi delle infestazioni legate a questo acaro sono aumentate non solo le opportunità di trasmissione dei virus ma anche il manifestarsi e l'aggravarsi dei loro sintomi. La relazione tra questo acaro e i virus è stata particolarmente studiata in rapporto alle infezioni legate al DWV che ad oggi è considerato in molti paesi come la principale causa di perdita di colonie infestate da *Varroa*. Vari studi hanno dimostrato che la comparsa degli effetti legati a questo virus, quali le ali deformi, è legata al suo livello piuttosto che alla sola presenza o assenza (Bowen-Walker *et al.*, 1999; de Miranda e Genersch, 2010) e l'incremento di questo dipende proprio dalla presenza di ulteriori fattori di stress, quali l'infestazione da *Varroa*. L'introduzione della *Varroa* in due isole delle Hawaii ha permesso ai ricercatori di monitorare l'effetto dell'acaro sulle popolazioni di api del luogo. Si è constatato che nelle isole ancora libere da *Varroa* c'era una grande diversità di virus e il DWV era presente a livelli piuttosto bassi. Tuttavia, nelle isole in cui era presente l'acaro vi era l'aumento del titolo di DWV, accompagnato da una riduzione della sua diversità genetica (Martin *et al.*, 2012).

1.6.1.2 I batteri

Le due più importanti e comuni malattie batteriche che colpiscono le api, in particolare larve e pupe, sono la peste americana (AFB) e la peste europea (EFB).

La AFB è una grave malattia batterica causata dal *Paenibacillus larvae*, un batterio Gram-positivo capace di produrre endospore estremamente resistenti al calore. Le spore, che rappresentano lo stadio infettivo del batterio, compaiono circa 10-11 giorni dalla schiusa delle uova, quando inizia a formarsi la prepupa, e alla sporulazione è accompagnata la morte dell'ape (Spivak e Reuter, 2001). Nella pappa reale è stato isolato un peptide con un probabile effetto inibitorio su *P.larvae*, il che può contribuire a determinare la maggiore resistenza delle giovani larve (Bilíková *et al.*, 2001). Gli adulti trasferiscono le spore ma non si ammalano: questo potrebbe essere dovuto alla presenza di una valvola proventricolare che

filtra le spore dal tratto digestivo così come a sostanze ad azione inibitoria trovate nell'intestino (Spivak e Reuter, 2001). A livello della colonia il meccanismo più importante di resistenza all'AFB è il comportamento igienico delle api operaie, che rapidamente rilevano e rimuovono dalla covata le larve infette (Spivak e Gilliam, 1998).

L'EFB è una malattia molto simile all'AFB ed è causata dal *Mellisococcus pluton*, batterio Gram-positivo isolato non solo nell'*A. mellifera* ma anche nell'*A. cerana* e *A. laboriosa* (Allen *et al.*, 1990). L'EFB colpisce la covata prima che venga sigillata, di solito uccidendo le larve al 4-5 giorno di età (Ashiralieva e Genersch, 2006). In natura, *M. plutonius* si moltiplica solo all'interno dell'intestino delle larve d'ape. Nella colonia la trasmissione e la persistenza del patogeno sembra dipendere dalla sopravvivenza degli individui infetti, che depositano i batteri con le loro feci. *M. plutonius* rimanere efficiente in questi depositi, sopravvivendo anche a lunghi periodi di essiccazione, e, anche se molte cellule batteriche vengono spazzate via, alcune riescono a infettare altre larve (Forsgren, 2010).

Per sopprimere la comparsa di queste malattie vengono utilizzati antibiotici, quali l'ossitetraciclina (Ashiralieva e Genersch, 2006). In molti paesi l'AFB e la EFB sono soggette a denuncia e la maggior parte delle autorità obbligano alla distruzione delle colonie malate e del materiale proveniente dagli alveari contaminati.

1.6.1.3 I funghi

La nosemiasi è una grave malattia delle api adulte, il cui agente patogeno è un fungo appartenente al phylum *Microsporidia*. In particolare nelle api colpite da questa malattia sono state ritrovate due specie di *Nosema*, *N. apis* e *N. ceranae* (Cox-Foster *et al.*, 2007). L'infezione da *Nosema* avviene generalmente attraverso l'ingestione di spore con cibo o acqua; le spore nell'intestino trovano condizioni di crescita ottimali, per cui germinano e iniziano a moltiplicarsi, per essere poi rilasciate con le feci. Oltre che all'intestino, *Nosema* può diffondersi anche ad altri tessuti, come le ghiandole ipofaringee, i tubuli malpighiani e i corpi grassi (Chen *et al.*, 2009). E' stato osservato che nelle colonie infette da *Nosema* vi è una correlazione positiva tra la presenza del fungo e il consumo di carboidrati.

L'aumento di tale domanda alimentare è probabilmente legato alla degenerazione delle cellule dell'intestino medio delle api infette, il che determinerebbe una riduzione nella capacità di assorbimento dei nutrienti (Martin-Hernandez *et al.*, 2011). Le infezioni da *Nosema* hanno, quindi, importanti conseguenze negative sulla salute dell'ape, causando tra l'altro dissenteria, riduzione delle aspettative di vita e una diminuzione in termini di dimensioni delle colonie (Malone *et al.*, 1995).

1.6.1.4 I virus

Tra i patogeni, i virus rappresentano una delle maggiori minacce per la salute e il benessere delle api e pertanto hanno richiamato l'attenzione tanto degli apicoltori quanto dei ricercatori.

I virus attaccano le api senza fare distinzioni tra fasi di sviluppo o caste, potendo quindi infettare le uova, le larve, le pupe, le api operaie, i fuchi e le regine. Studi sulla distribuzione dei virus delle api hanno evidenziato che in una singola ape possono essere presenti numerosi virus contemporaneamente, così come più virus possono essere rilevati in varie api di una stessa colonia (Chen *et al.*, 2004; Baker e Schroeder, 2008). Sebbene di solito persistano come infezioni inapparenti senza provocare segni evidenti di malattia, in alcune condizioni di stress, legati ad esempio ad una cattiva nutrizione, a condizioni ambientali difficili o alla presenza di altri parassiti o patogeni, essi possono aumentare di numero e scatenare infezioni conclamate che influenzano notevolmente la salute delle api, riducendone la durata della vita (Martin, 2001). E' interessante notare che la prevalenza dei virus sembra essere temporale; la maggior parte delle infezioni virali si presentano, infatti, nel periodo estivo (Runckel *et al.*, 2011). La trasmissione avviene sia orizzontalmente, attraverso individui della stessa generazione, che verticalmente, dalla madre infetta alla propria prole (Chen *et al.*, 2006 a).

I virus in grado di attaccare le api sono circa 18, appartenenti soprattutto alle famiglie dei *Dicistroviridae* e dei *Iflaviridae* (Evans e Schwarz, 2011). Di questi alcuni, quali "Black Queen Cell Virus" (BQCV), "Sacbrood Virus" (SBV), "Kashmir Bee Virus" (KBV), "Chronic Bee Paralysis Virus" (CBPV), "Acute

BeeParalysisVirus” (ABPV) e “Deformed Wing Virus” (DWV), sono le più comuni cause d’infezioni delle api e attualmente sono oggetto di un’intensa attività di ricerca.

1.6.1.4.1 Black Queen Cell Virus (BQCV)

Il “Black Queen Cell Virus” (BQCV) è un *Picornavirus*, appartiene alla famiglia *Dicistroviridae*, con un genoma costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva. Esso è stato riscontrato per la prima volta in larve morte di api regine raccolte in celle che presentavano un aspetto annerito, caratteristica che ha poi determinato la genesi del nome dell’infezione (Bailey e Woods, 1977). BQCV è diffuso in tutta Europa; generalmente questa malattia determina la morte delle api regine allo stadio di prepupa, sebbene sia stata riscontrata anche nelle larve operaie e nei fuchi (Siede e Buchler, 2003; Chen *et al.*, 2006). Studi in campo hanno evidenziato come l’andamento della malattia sia collegata all’infezione da *N. apis*. Infatti quando l’incidenza di *N. apis* è alta, durante la primavera e l’inizio dell’estate, l’infezione di BQCV nelle api è maggiore. In particolare si pensa che proprio l’infezione delle cellule intestinali da parte di *N. apis* aumenti la suscettibilità del tratto alimentare alle infezioni da BQCV (Bailey e Ball, 1991).

1.6.1.4.2 Sacbrood Virus (SBV)

Il “*Sacbrood Virus*” (SBV) è stato il primo virus associato a una malattia nelle api (White, 1917). Esso attacca sia la covata che le api adulte, anche se le larve di 2 giorni di età sono più suscettibili alle infezioni da SBV (Ball e Bailey, 1997). SBV colpisce le api adulte senza provocare segni palesi di malattia, anche se in alcuni casi la durata di vita media degli insetti infetti è sensibilmente ridotta (Bailey e Fernando, 1972). La diffusione iniziale di tale virus all’interno di una colonia si verifica quando le api nutrici si infettano durante la rimozione delle larve morte per SBV. Particelle virali si accumulano nelle ghiandole ipofaringee delle api che possono diffondere il virus alle larve, durante l’alimentazione, e alle altre api adulte, tra cui le bottinatrici, durante lo scambio il cibo. Le api bottinatrici infette possono a loro volta diffondere il virus attraverso le secrezioni ghiandolari lasciate sul polline (Chen e Siede, 2007). Le giovani larve malate presentano una cuticola coriacea e non maturano a pupe in quanto incapaci di eliminare la vecchia

cuticola. Una grande quantità di liquidi, contenente milioni di particelle di SBV, si accumula tra il corpo della larva malata e la sua cuticola formando un'escrescenza simile ad una sacca piena d'acqua (Bailey e Ball, 1991).

1.6.1.4.3 Kashmir Bee Virus (KBV)

Il “Kashmir Bee Virus” (KBV) è stato isolato per la prima volta in *A. mellifera* adulte inoculate sperimentalmente con un estratto preparato da api (*A. cerana*) provenienti dal Kashmir, regione nord-occidentale dell'India, da cui il nome. Successivamente il KBV è stato rilevato in *A. mellifera* raccolte in Australia (Bailey e Woods, 1977). KBV attacca tutte le fasi del ciclo vitale delle api e in natura persiste all'interno della covata, mentre gli adulti non presentano alcun sintomo (Anderson e Gibbs, 1988). Prove eseguite in laboratorio mostrano che, tra tutti i virus capaci di infettare le api, il KBV sia quello più virulento. Infatti, in seguito ad iniezione nell'emolinfa dell'ape, il virus si moltiplica rapidamente e può portare alla morte nell'arco di 3 giorni (Bailey *et al.*, 1979). KBV è sierologicamente, biologicamente e geneticamente simile ad ABPV, sebbene i due virus possano essere facilmente distinguibili mediante RT-PCR (Evans, 2001) e mostrino anche differenze nei profili proteici del capsido (Allen e Ball, 1995).

1.6.1.4.4 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)

Sebbene i sintomi della “paralisi” associati alla “Paralisi Cronica delle Api” furono descritti per la prima volta più di duemila anni fa da Aristotele, solo nel 1963 è stato scoperto il virus responsabile di tale malattia (CBPV) (Bailey *et al.*, 1963). Sono essenzialmente due i sintomi associati a questo virus (Fig. 1.3). Nel primo caso le api, che spesso presentano un addome gonfio e ali “dislocate”, possono manifestare un'incapacità a volare e presentare un tremore anomalo, per poi morire nell'arco di un paio di giorni. Alcune colonie mostrano tuttavia una serie diversa di sintomi. In questo caso le api perdono il pelo che le ricopre ed appaiono nere e lucide; mostrano l'incapacità a volare nel giro di pochi giorni e muoiono poco dopo (Bailey e Ball, 1991). Attraverso studi condotti in laboratorio è stato osservato che le api adulte sono suscettibili all'infezione da CBPV sia mediante somministrazione topica, che attraverso iniezione e alimentazione. La dose infettiva per iniezione di CBPV nelle api adulte è simile a quella di ABPV

ma, a differenza di quest'ultima, non è stata riscontrata nessuna associazione tra i focolai di paralisi legati al CBPV e le infestazioni da *Varroa* (Ball e Allen, 1988). Questo suggerisce che il contributo della *Varroa* alla diffusione di questo virus, se esiste, è piuttosto modesto.

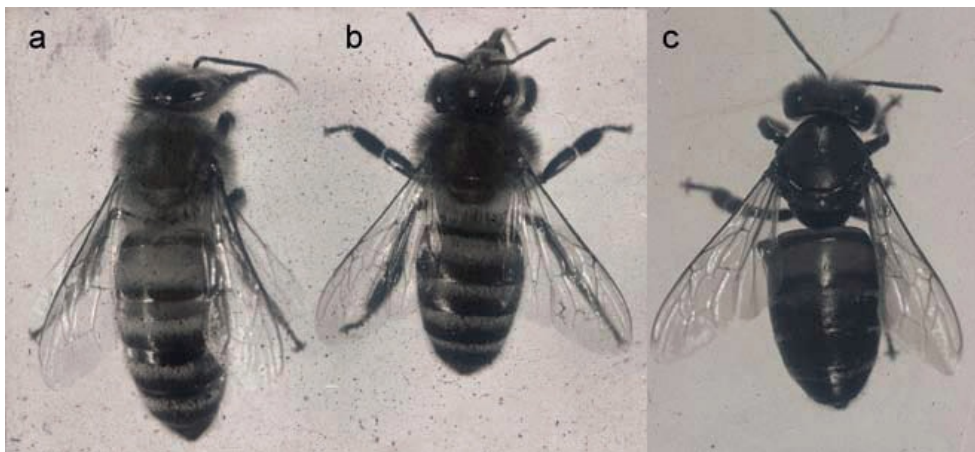


Figura 1.3 - Api affette da CBPV. Si possono notare le differenze morfologiche tra l'ape affetta da CBPV di tipo 1 (a) e l'ape affetta da CBPV di tipo 2 (c) rispetto al controllo (b), dato dall'ape non malata (Aubert *et al.*, 2008).

1.6.1.4.5 Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)

Il “virus della paralisi acuta delle api” (ABPV), riscontrato sia nelle larve che negli adulti di ape, è stato identificato come uno tra le principali cause di declino e collasso degli alveari tanto in Europa quanto negli Stati Uniti.

Questo virus è stato scoperto e isolato per la prima volta durante prove di infettività in laboratorio con CBPV. Quando tali virus erano somministrati mediante alimentazione, per contatto, o tramite iniezione nell'emolinfa in api sane, queste iniziavano a tremare e andavano incontro a paralisi nel giro di pochi giorni. Tuttavia le api infettate con ABPV morivano prima (paralisi acuta) delle api infettate con CBPV (paralisi cronica) (Bailey *et al.*, 1963). Diverse prove dimostrano che uno dei principali vettori del virus è la *Varroa* (Chantawannakul *et al.*, 2006). Tuttavia il virus non si replica all'interno del suo vettore, come mostra il declino nel tempo dell'efficienza di trasmissione da parte dell'acaro (Wiegers, 1986). La diffusione di ABPV all'interno delle colonie è legata

soprattutto alle secrezioni ghiandolari delle api malate e si realizza in particolare durante l'alimentazione delle giovani larve da parte di nutrici infette. ABPV è stato però rilevato anche nello sperma dei fuchi, suggerendo che tale virus possa essere trasmesso anche verticalmente (Yue *et al.*, 2006).

1.6.1.4.6 Deformed Wing Virus (DWV)

Il virus delle ali deformi, o DWV, è un virus a RNA appartenente all'ordine dei *Picornavirales*. Esso è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva racchiuso all'interno di un capsido a struttura icosaedrica, del diametro di circa 30 nm, formato da 3 proteine, VP1, VP2 e VP3. L'organizzazione del genoma è tipica dei virus della famiglia degli *Iflaviridae* e comprende una singola "open reading frame" (ORF) affiancata da una lunga regione non tradotta al 5' (5' UTR) e da una breve e altamente conservata regione non tradotta al 3' (3' UTR), che termina con una coda formata da numerose basi di adenina (coda poli-A+). Entrambe le regioni non tradotte sono coinvolte nella regolazione della replicazione e della traduzione del genoma virale e, di conseguenza, interagiscono con numerosi fattori dell'ospite necessari alla realizzazione di questi processi. Ad esempio la regione 5'UTR contiene un "internal ribosome entry sites" (IRES) che consente l'attacco del ribosoma della cellula ospite all'RNA virale e permette quindi l'avvio della traduzione, indipendentemente dalla presenza del CAP al 5' (de Miranda e Genersch, 2010).

Il DWV è stato isolato per la prima volta in Giappone da api adulte malate (*A. mellifera*) infestate da *Varroa* (Bailey e Ball, 1991) e da allora sono stati riscontrati casi in quasi tutto il mondo. Esso è stato chiamato in passato "ceppo giapponese del virus delle api d'Egitto (EBV)" a causa della sua lontana correlazione sierologica con questo virus, dal quale è stato poi ampiamente distinto (Ball, 1989). Il nome che gli è stato successivamente attribuito, e che oggi lo identifica, fa riferimento al caratteristico sintomo associato a tale malattia, ossia lo sfarfallamento di api con ali deformi o così poco sviluppate da renderle incapaci di volare (Fig. 1.4).



Figura1.4 - Ape affetta da DWV. Si osserva sul torace la presenza di uno degli acari che ha parassitizzato la pupa e che appare ancora aggrappato all'ape (de Miranda e Genersch, 2010).

Il DWV è stato ritrovato non solo in *A. mellifera* ma anche in *A. cerana* e in *A. florea*, nonché in alcuni bombi (*Bombus terrestris*, *Bombus pascuorum*) (Genersch *et al.*, 2006). Esso è stato inoltre riscontrato anche in *V. destructor* (Ribière *et al.*, 2008) e in *Tropilaelaps mercedesae* (Forsgren *et al.*, 2009), ectoparassiti coinvolti nella trasmissione del virus e che si nutrono dell'emolinfa delle api. Di recente è stato inoltre dimostrato che il DWV può infettare anche il piccolo coleottero dell'alveare *Aethina tumida* (Eyer *et al.*, 2009). Il DWV infetta tutti gli stadi di sviluppo delle api, compreso le uova, le larve e gli adulti (Tentcheva *et al.*, 2006). Analisi dettagliate eseguite mediante RT-PCR sia su api con ali deformi che asintomatiche, fuchi, pupe e larve provenienti da colonie malate hanno evidenziato differenze nei titoli virali, con pupe che presentavano una più alta concentrazione, seguite dalle api con le ali deformi, larve, api sintomatiche e fuchi (Chen *et al.*, 2005). Il virus si localizza principalmente a livello dell'addome e in misura minore nel torace e nel cervello delle api adulte, in particolare a livello dei neuropili ottici, dei lobi antennali e dei corpi fungiformi (Chen *et al.*, 2006b). Esso è stato inoltre rilevato a livello delle vescicole seminali dei fuchi e degli ovari delle regine, suggerendo quindi che la diffusione possa avvenire attraverso la trasmissione venerea durante accoppiamento, nonché mediante trasmissione verticale dalle regine infette alla progenie (Fievet *et al.*, 2006). Rilevante è anche la trasmissione orizzontale all'interno della colonia attraverso trofallassi, feci e secrezioni delle ghiandole salivari (Chen *et al.*,

2006a). Queste vie di trasmissione non causano però sintomi evidenti, ma permettono al virus di mantenersi all'interno della colonia. Le trasmissioni associate a vettori, in particolare la *Varroa*, si traducono spesso in infezioni più virulente. Infatti, quando l'infestazione da *Varroa* è bassa o assente il DWV permane nella colonia in forma latente senza dare sintomi apparenti; le infezioni virali si palesano invece in condizioni di grave infestazione (Martin, 2001). Non a caso i sintomi clinici legati all'infezione da virus, quali le ali deformi, le dimensioni ridotte del corpo e la riduzione della longevità delle api, furono in passato attribuite esclusivamente agli effetti legati all'alimentazione da parte della *Varroa* (Koch e Ritter, 1991). Oggi sussistono numerose prove che dimostrano la diretta associazione tra la comparsa di tali sintomi e l'infezione da parte del DWV (Möckel *et al.*, 2011).

1.6.2 Relazione DWV-Varroa

I meccanismi alla base del passaggio del DWV da virus relativamente innocuo a importante patogeno delle api in presenza di *Varroa* rimangono ancora poco chiari, anche se è evidente che sussiste un ridotto funzionamento del sistema immunitario delle api, largamente imputabile allo stesso virus (Nazzi *et al.*, 2012).

Uno dei bersagli principali nella strategia di virulenza adottata dal DWV è rappresentato da NF- κ B, fattore che regola la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta immunitaria dell'ape e non solo (Nazzi *et al.*, 2012). Analisi trascrittomiche eseguite su colonie di api infestate da *Varroa* e con alti livelli di DWV hanno messo in luce la sottoespressione di 19 geni coinvolti nella risposta immunitaria, ma di questi il gene maggiormente sottoespresso è stato *dorsal-1A*, che codifica un membro della famiglia di fattori trascrizionali NF- κ B (Nazzi *et al.*, 2012). Lo stesso silenziamento di tale gene, mediante RNAi, è in grado di promuovere la replicazione del DWV (Nazzi *et al.*, 2012). *Dorsal 1-A* è coinvolto non solo nella risposta antivirale ma anche nei processi di melanizzazione e coagulazione che vengono stimolati dalla parassitizzazione da parte dell'acaro, che per nutrirsi crea un foro di alimentazione sulla cuticola del proprio ospite (Evans *et al.*, 2006). In quest'ottica il modello che meglio inquadra

la complessa rete di relazioni che esistono tra l'ape e i suoi patogeni vede al centro il sistema immunitario dell'ape e uno dei principali fattori trascrizionali che lo regolano, NF- κ B, mentre il virus, dal canto suo, mette in campo una modulazione trascrizionale negativa di *dorsal 1-A*, che cresce al crescere del titolo virale (Fig. 1.5) (Nazzi *et al.*, 2012). Questo delicato bilancio immunitario può essere alterato da diversi fattori di stress, quali l'infestazione da parte della *Varroa* che, stimolando le risposte di difesa e operando un intenso stress metabolico, sottrae le risorse necessarie a mantenere attive le barriere antivirali. Questo promuove la replicazione del DWV e quindi il passaggio da infezione virale latente a conclamata.

In questo quadro funzionale, altri agenti di stress che possono determinare una compromissione della competenza immunitaria possono contribuire alla stimolazione della replicazione virale con effetti negativi crescenti.

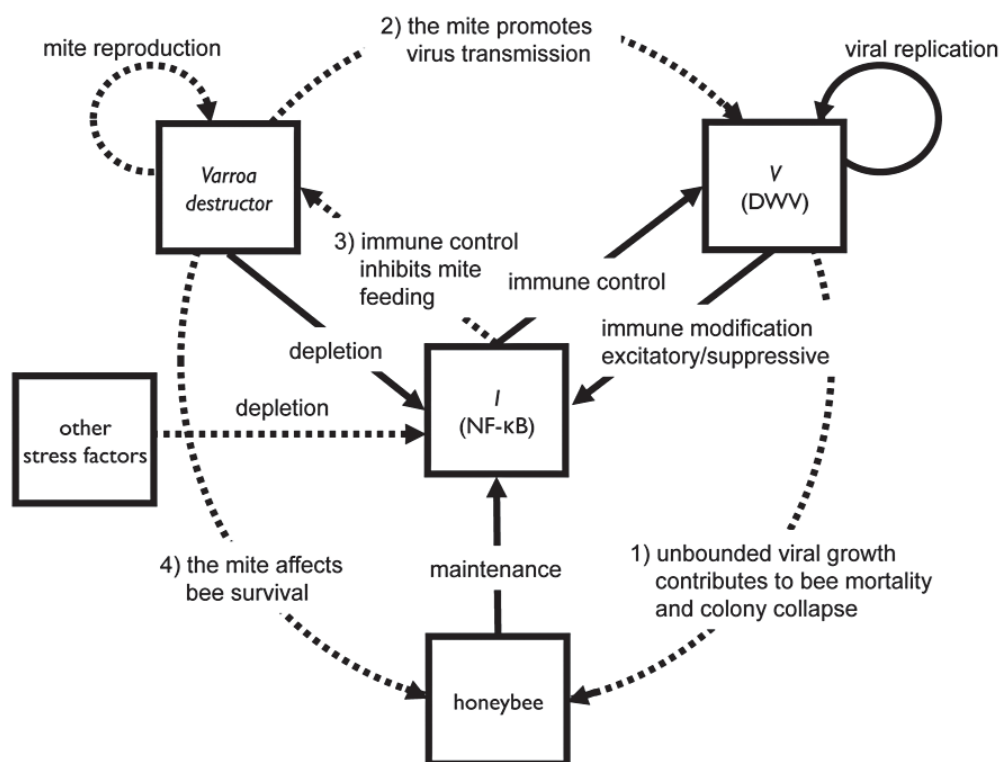


Figura 1.5 - Rappresentazione schematica dei fattori che possono influenzare la fitness dell'ape. In questo modello si nota come l'attività del sistema immunitario è influenzato da processi intrinseci dell'ape, che tendono a stabilizzarlo, da fattori legati alla replicazione del DWV e all'infestazione da *Varroa*, e da ulteriori fattori di stress esterni (Nazzi *et al.*, 2012).

1.6.3 Gli insetticidi: i neonicotinoidi

Fra i vari agenti di stress che possono contribuire al declino della competenza immunitaria delle api, un ruolo particolare è da attribuire agli insetticidi. Negli ultimi decenni abbiamo assistito alla crescita di un fiorente mercato creatosi intorno allo sviluppo dei prodotti fitosanitari, quali gli insetticidi chimici, che contribuiscono significativamente a far fronte all'intensa domanda alimentare legata alla rapida crescita della popolazione mondiale (Oerke e Dehne, 2004). Una particolare attenzione è stata data ai neonicotinoidi, una nuova classe di insetticidi sintetici utilizzati per proteggere le colture dall'azione di parassiti quali gli afidi, gli aleurodidi, i tisanotteri, alcuni micro-lepidotteri e un certo numero di coleotteri (Jeschke *et al.*, 2011). A partire dagli inizi del 1990, quando furono messi per la prima volta in commercio, i neonicotinoidi sono diventati rapidamente la classe di insetticidi più venduta al mondo (Jeschke *et al.*, 2011). Grazie ad alcune caratteristiche, come la bassa tossicità per i vertebrati e la capacità di diffondere in tutti i tessuti della pianta (sistemicità), essi sono stati facilmente adottati per l'uso sia in ambiente agricolo che urbano (EPA, 2003). I neonicotinoidi sono, inoltre, piuttosto persistenti e sono quindi in grado di agire in un ampio intervallo di tempo: l'emivita di questi composti in condizioni aerobiche del suolo può variare ampiamente, ma è comunque espressa nell'ordine di mesi (da 148 a 1155 giorni per il clothianidin) (EPA, 2003). Considerando la struttura molecolare di queste sostanze possiamo distinguere i composti nitrosostituiti (imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin e dinotefuran) e quelli cianosostituiti (Acetamiprid, Tiacloprid) (Fig. 1.6) (Farooqui, 2012). Essi esplicano la loro funzione agendo come agonisti dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChR). Tali composti non subiscono l'azione dell'acetilcolinesterasi, enzima deputato a idrolizzare l'acetilcolina ed a impedire i danni da sovrastimolazione dei nAChR; in questo modo i neonicotinoidi sono in grado di sovrastimolare tali recettori in modo irreversibile portando gli organismi a paralisi e a morte (Brown *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2013). Questi insetticidi interferiscono con la trasmissione dei messaggi neurali in molto più efficiente negli insetti che nei mammiferi e negli altri vertebrati, suggerendo che il gruppo nitro (-NO₂) e ciano (-CN)

contribuiscono a determinare la selettività per i nAChR degli insetti (Decourtye e Devillers, 2010).

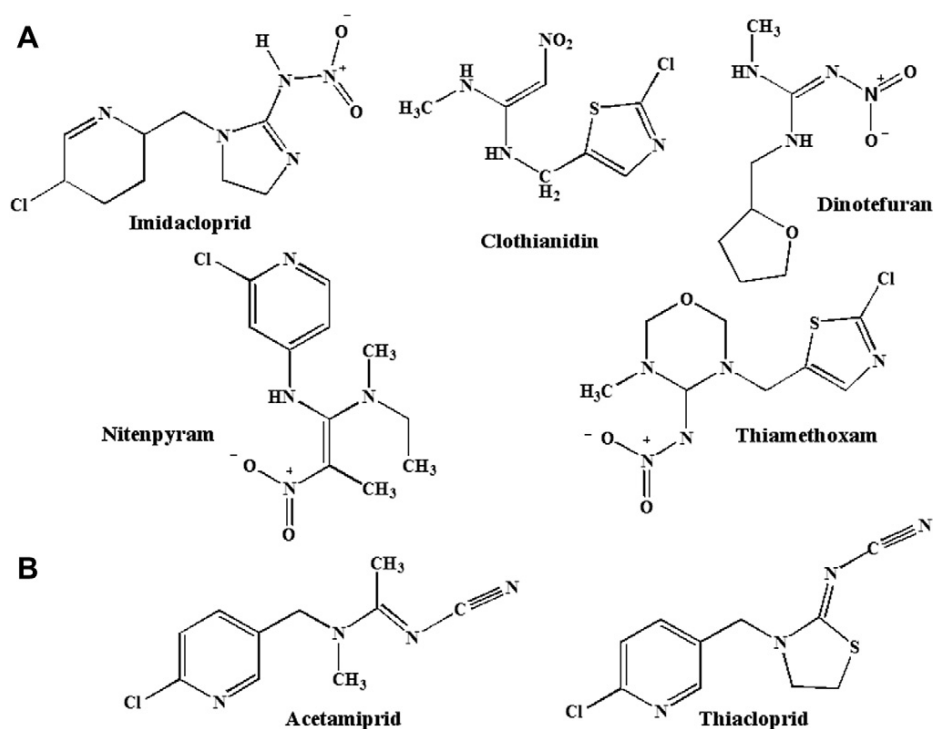


Figura1.6 - Struttura chimica dei principali neonicotinoidi usati in campo agricolo. Si noti la differente struttura dei composti nitro-sostituiti (A) e ciano-sostituiti (B) (Farooqui, 2012).

Ad oggi vi sono però numerose questioni ancora irrisolte riguardo al potenziale impatto che l'azione dei neonicotinoidi possa avere sulla salute e sulla stabilità delle colonie di api (Blacquièrre *et al.*, 2012). Infatti, benchè gli insetticidi sono progettati per agire esclusivamente sugli insetti bersaglio, spesso possono nuocere in modo non voluto altri organismi non dannosi. Tra questi spiccano proprio le api che, a causa dei moderni sistemi di coltivazione che spesso fanno uso di insetticidi, possono essere facilmente esposti a tali sostanze. Le api foraggere, e in modo indiretto tutta la colonia, possono essere esposte ai neonicotinoidi, così come alle altre sostanze xenobiotiche, in differenti modi, come ad esempio per contatto diretto durante il rilascio dell'insetticida, per contatto con piante che

presentano residui o ancora per esposizione a nettare e polline contaminato (Fig. 1.7) (Krupke *et al.*, 2012).

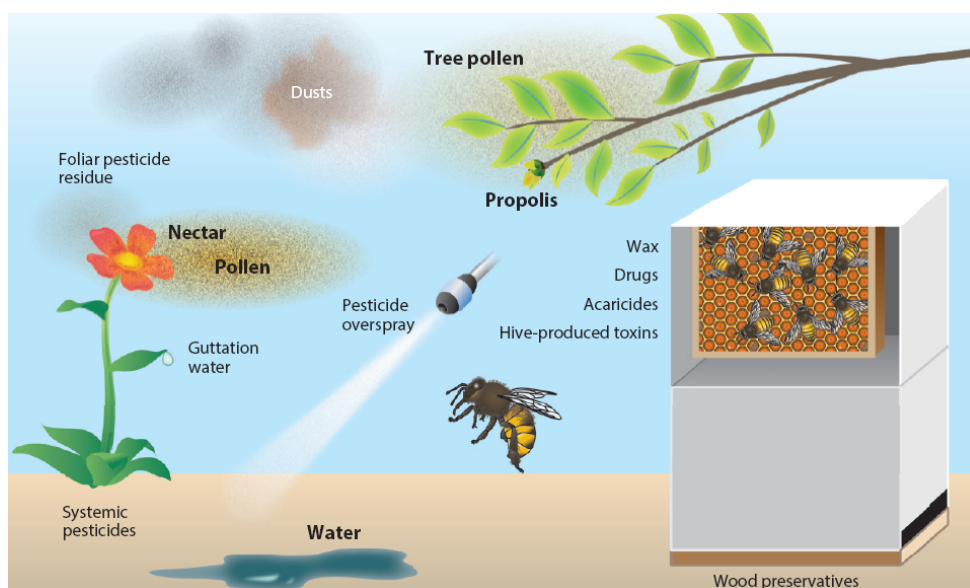


Figura 1.7 - Vie di esposizione delle api alle sostanze xenobiotiche. In grassetto è evidenziato il materiale raccolto dalle api foraggiere (Johnson, 2015).

Un grosso inventario fatto da Chauzat e dai suoi collaboratori su campioni di polline e miele raccolti nell'arco di 3 anni in 5 diversi siti della Francia ha evidenziato in questi la presenza di residui di imidacloprid pari rispettivamente al 40,5% e al 21,8% (Chauzat *et al.*, 2006; Chauzat *et al.*, 2011).

La tossicità dei pesticidi dipende anche dalla via di esposizione e, generalmente, l'esposizione per contatto risulta essere meno tossica di quella per via orale. Diversi studi hanno dimostrato come la DL_{50} dei neonicotinoidi somministrati per via orale mostri un'ampia variabilità. E' però probabile che tali dati siano influenzati da fenomeni quali la trofallassi, che può contribuire a determinare differenze nella diffusione e nell'accumulo degli insetticidi tra le api operaie, così come dagli effetti legati alle alte dosi di neonicotinoidi (Blacquière *et al.*, 2012). I composti nitro-sostituiti applicati topicamente presentano una maggiore tossicità per le api, con una DL_{50} nell'ordine di nanogrammi, rispetto ai ciano-sostituiti, che hanno invece una DL_{50} espressa in microgrammi (Iwasa *et al.*, 2004). Numerosi studi condotti in laboratorio hanno dimostrato con successo che i neonicotinoidi, da soli o in combinazione con altri fattori, possono determinare

sulle api alterazioni comportamentali e fisiologiche. A livello comportamentale si sono osservate anomalie nell'attività di foraggiamento, riduzione della memoria olfattiva e delle performance nell'apprendimento, disorientamento e ridotta comunicazione (Henry *et al.*, 2012). L'attività motoria delle api risulta inoltre aumentata a bassissimi dosaggi di imidacloprid (fino ad 1,25 ng/ape) mentre tende a diminuire sempre più aumentando le dosi di pesticida fornito, fino a determinare la paralisi dell'insetto (da 2,5 a 20 ng/ape) (Desneux *et al.*, 2007). Per quanto riguarda gli effetti fisiologici, oltre alle alterazioni legate al mal funzionamento dei nAChR, si osservano danni neurofisiologici dovuti, ad esempio, a una maggiore attivazione della citocromo ossidasi (CO), enzima coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni e quindi nella respirazione cellulare. In particolare, 30 minuti dopo il trattamento orale delle api con imidacloprid (con una dose corrispondente alla DL₂₀) si osserva una riduzione della memoria olfattiva, associata ad un'alterazione dell'attività della CO a livello dei calici dei corpi fungiformi (Decourtye *et al.*, 2004).

L'esposizione ai neonicotinoidi influenza negativamente la risposta immunitaria dell'ape e questo sembra riflettersi in una maggiore suscettibilità dell'insetto ai patogeni. E' stato dimostrato che dosi subletali di insetticidi, quali il fipronil o il thiacloprid, determinano un significativo aumento della mortalità delle giovani api operaie precedentemente infettate da *N. ceranae* (Vidau *et al.*, 2011). In seguito all'esposizione di tre generazioni di covata a dosaggi di imidacloprid di 5 ppb e 20 ppb (valori inferiori a quelli che influiscono negativamente sulla longevità o sul foraggiamento nelle api), si osserva una maggiore suscettibilità delle api adulte a *N. ceranae* (Pettis *et al.*, 2012). L'esposizione di giovani api neosfarfallate a quantità crescenti di due neonicotinoidi quali il clothianidin e l'imidacloprid, con dosi inferiori alla DL₅₀, determina, inoltre, un significativo aumento della replicazione del DWV. Al contrario, questa proliferazione virale non viene riscontrata in seguito ad esposizione ad un organofosfato, quale il clorpirifos (Di Prisco *et al.*, 2013). Non è ancora del tutto chiaro quali siano i meccanismi alla base di questa attività immunosoppressiva. Alcune proteine che presentano un sito ricco di residui di leucine, note come NLR (Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat), rivestono un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria, in quanto alcuni membri di tale famiglia fungono da modulatori negativi di NF-κB. Esse sono quindi coinvolte nella regolazione negativa della

reazione immunitaria, fondamentale per evitare gli effetti dannosi legati a un eccessiva risposta (Lich e Ting, 2007). In larve di drosophila (*D. melanogaster*) sottoposte a immunostimolazione si osserva infatti una riduzione dell'espressione della proteina LRR e un contemporaneo aumento dell'espressione di un AMP sotto il controllo del pathway Toll, quale la defensina (Di Prisco *et al.*, 2013). Di Prisco *et al.* (2013) hanno evidenziato come LRR sia uno dei possibili bersagli molecolari dei neonicotinoidi, osservando come l'esposizione al clothianidin di api immunistimolate determini un incremento del tasso di trascrizione di tale fattore, a cui è associata una riduzione della capacità dell'insetto di rispondere all'infezione, come indicato dalla ridotta espressione dell'apidaecina, AMP sotto il controllo del pathway Toll (Di Prisco *et al.*, 2013).

1.6.4 Gli stress alimentari

Le moderne e intensive pratiche agricole, caratterizzate dal diffondersi delle monoculture, associate alla scomparsa delle zone selvatiche o semi-selvatiche non solo rischiano di lasciare le colonie di api a corto di risorse alimentari durante i periodi di penuria ma anche, a causa della mancanza della biodiversità naturale, di alterare la composizione della loro dieta (Kremen *et al.*, 2002). Tali stress nutrizionali, legati a periodi di fame, a variazione del rapporto tra carboidrati e proteine nella dieta o alla mancanza di alcuni degli amminoacidi essenziali, possono avere conseguenze sulla salute delle api e contribuire alla perdita delle colonie. Alcuni studi hanno dimostrato che, benchè le api possono sopravvivere su una dieta contenete solo carboidrati, l'aggiunta delle proteine determini un aumento della longevità (Manning *et al.*, 2007). L'aggiunta di polline nella dieta è anche fondamentale per il corretto sviluppo dell'organismo, basti pensare che le proteine costituiscono circa il 66-74% della massa corporea di un ape neosfarfallata (Brodschneider e Cailsheim, 2010). Una dieta contenente una corretta percentuale di proteine permette un corretto sviluppo delle ghiandole ipofaringee e delle ovaie, così come favorisce la maturazione dei muscoli del volo nelle giovani api neosfarfallate (Hoover *et al.*, 2006). Una dieta priva di proteine riduce l'attività metabolica degli emociti ma ne aumenta il numero (soprattutto dei granulociti), probabilmente come meccanismo compensatorio (Szymas e

Jedruszuk, 2003). Alaux *et al.* (2010) hanno confermato questo aumento della concentrazione di emociti, evidenziando però una riduzione dell'attività della glucosio ossidasi (indicatore dell'immunità sociale) e della massa di fat body (indicatore indiretto dell'immunocompetenza delle singole api). L'aggiunta di polline nella dieta determina, inoltre, lo sviluppo di api con più bassi titoli di DWV rispetto a quelle nutrite con solo zucchero, indicando un ruolo vitale delle proteine nelle risposte immunitarie (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010). Anche la qualità delle proteine sembra influenzare la fitness delle api; non a caso Rinderer e i suoi colleghi hanno notato una diminuzione della mortalità causata dalla AFB in seguito ad esposizione delle larve a una dieta integrata con polline raccolto da una grossa varietà di fonti di fiori (Rinderer *et al.*, 1974). Di conseguenza, non è solo il contenuto proteico ma anche la qualità e la diversità del polline presente nella dieta a influenzare la fitness delle api e la capacità di queste di far fronte ai diversi fattori di stress (Alaux *et al.*, 2010).

In numerosi organismi è stato dimostrato il collegamento tra nutrizione e immunità, evidenziando come la risposta immunitaria possa essere influenzata da una restrizione calorica (Franca *et al.*, 2009). Recenti studi di nutrigenomica hanno inoltre evidenziato gli effetti che particolari fonti di carboidrati e proteine possono avere sul profilo trascrizionale di api adulte. Molecole presenti nel miele, ma non in altre fonti alimentari, regolano positivamente alcuni pathway di disintossicazione dell'intestino e l'espressione di geni associati al metabolismo delle proteine e alle reazioni di ossido-riduzione (Mao *et al.*, 2013; Wheeler e Robinson, 2014). Il polline influenza l'espressione di geni che condizionano la longevità, la funzione immunitaria, la produzione di taluni AMP e i processi di disintossicazione da pesticidi (Alaux *et al.*, 2011; Schmehl *et al.*, 2014).

Il mantenimento e l'attivazione del sistema immunitario rappresentano inoltre uno dei processi fisiologici più impegnativi da un punto di vista energetico e riduzioni dell'energia disponibile (ad esempio in seguito a digiuno) riducono le funzioni immunitarie, aumentando la predisposizione alle malattie (Shiva-Jothy e Thompson, 2002). Freitak *et al.* (2003) hanno dimostrato che durante lo stadio di pupa la cavolaia minore aumenta il suo normale tasso metabolico dell'8% durante una sfida immunitaria. D'altra parte, alcuni insetti (come ad esempio i grilli) impiegano il 78% del loro bilancio energetico quotidiano nel mantenimento dei

processi fisiologici (Hack, 1997). Se tale importo risulta significativamente aumentato in seguito ad una sfida immunitaria, possono essere minori le energie impiegate in altri processi fisiologici non vitali, quali la crescita o la riproduzione. Non a caso ci sono prove che evidenziano la soppressione della riproduzione negli insetti in seguito ad attivazione della risposta immunitaria (Siva-Jothy *et al.*, 2005). Similmente, esperimenti condotti in larve di *Drosophila* evidenziano una riduzione nella fosforilazione di Akt e, di conseguenza, una minore attivazione del pathway dell'insulina in seguito a una sfida immunitaria. Questo determina un'inibizione dei processi anabolici, quali la sintesi e l'accumulo di trigliceridi e glicogeno, e una riduzione nella crescita dell'insetto (DiAngelo *et al.*, 2009). Allo stesso modo l'attivazione di questo pathway metabolico altera la risposta immunitaria dell'organismo attraverso la modulazione di NF- κ B (Pakpour *et al.*, 2012). Nelle api il rapporto tra metabolismo e immunità diventa ancor più complesso quando si somma l'influenza della parassitizzazione da parte della *Varroa*, il che rende non più sufficiente il contributo dell'alimentazione nel combattere le infezioni virali (Fig. 1.8). Nelle api infestate da *Varroa* si osserva una diminuzione nel metabolismo delle proteine, l'inibizione di alcuni geni dell'immunità e l'aumento dei livelli del virus che non può essere invertito dall'alimentazione con polline. Infatti, api operaie parassitizzate durante lo sviluppo presentano livelli inferiori di proteine che non aumentano tramite alimentazione, anche se si dispone di sufficiente polline (van Dooremalen *et al.*, 2013). Analogamente pupe infestate da *Varroa* presentano un peso minore rispetto a quelle non infestate, così come un contenuto di proteine corporee significativamente più basso ed elevati livelli di aminoacidi liberi, suggerendo quindi che la sintesi proteica, e in definitiva la crescita, vengono inibiti dalla *Varroa* (Aronstein *et al.*, 2012), anche se il probabile ruolo di infezioni virali associate non può essere assolutamente escluso e sembra essere predominante, almeno in termini di compromissione della risposta immunitaria (Nazzi *et al.*, 2012; Nazzi e Pennacchio 2014; Di Prisco *et al.*, 2016).

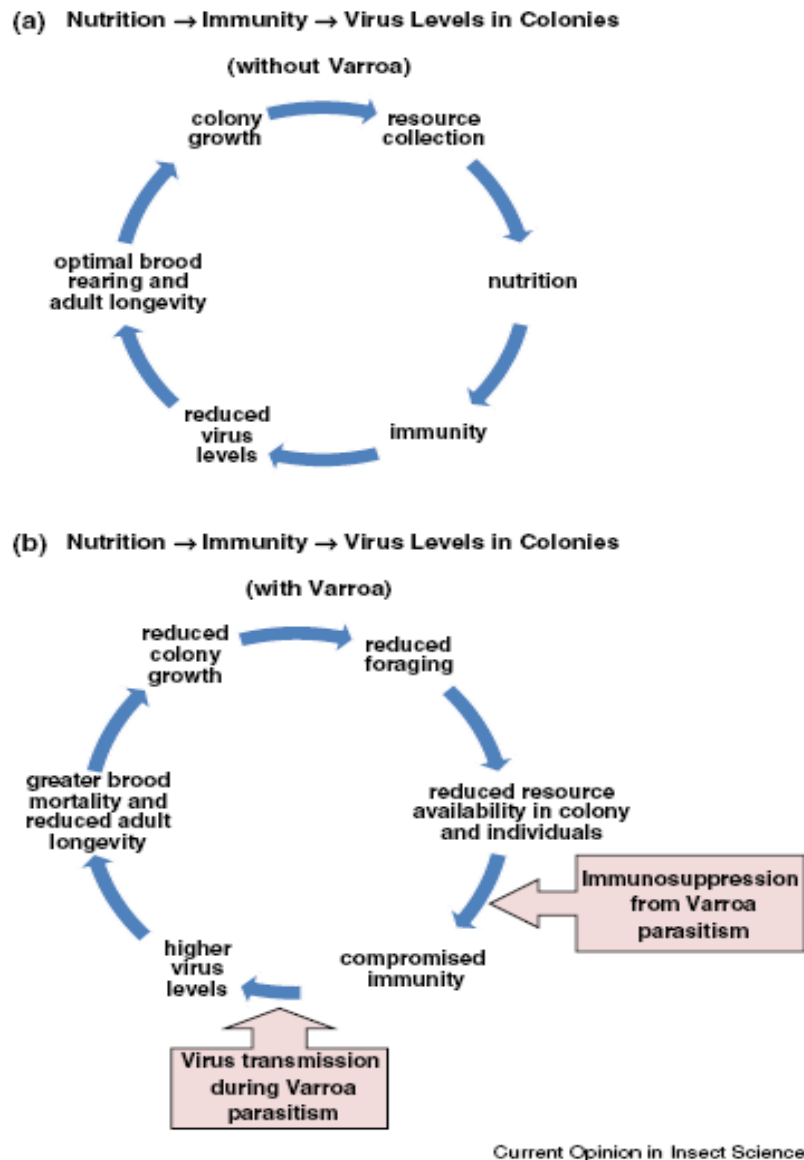


Figura 1.8 - Schema dei rapporti tra nutrizione, immunità e livelli di virus. Si notino (a) gli effetti sulla crescita delle colonie non parassitizzate e (b) i cambiamenti nelle relazioni quando le api sono parassitizzate dalla *Varroa* (DeGrandi-Hoffman e Chen, 2015).

1.7 Scopo della tesi

I fenomeni di mortalità e di perdita di intere colonie d'api registrate negli ultimi anni rappresentano un problema che ha impatto non solo sul settore apistico ma, più in generale, sull'agricoltura e sull'ambiente.

Tra tutti i possibili agenti causali biotici e abiotici, parassiti e patogeni sembrano giocare un ruolo particolarmente importante (Ratnieks e Carreck, 2010; Neumann *et al.*, 2010). Il parassita *Varroa* i patogeni virali ad esso connesso rappresentano gli elementi più comunemente associati alla diminuzione di popolazioni d'api e all'eventuale collasso delle colonie. Quest'associazione sembra tanto più significativa quando il patogeno coinvolto è il DWV (Di Prisco *et al.*, 2011; Highfield *et al.*, 2009; Dainat *et al.*, 2012). L'ampio uso di pesticidi chimici in agricoltura sembra contribuire al declino della popolazione delle api (Gill *et al.*, 2012). L'attenzione è stata data in particolare a una nuova classe di pesticidi, quali i neonicotinoidi, considerati tra i principali fattori abiotici responsabili della moria delle api (Blacquièrre *et al.*, 2012). Anche gli stress nutrizionali, legati soprattutto alla perdita degli habitat naturali e al diffondersi delle monoculture, giocano un ruolo non secondario nell'indebolire le famiglie d'api (Kremen *et al.*, 2002).

Benché vi sia un largo consenso all'interno della comunità scientifica sull'ipotesi che tale sindrome non sia imputabile ad un singolo fattore, ma piuttosto dipenda da più cause scatenati, rimangono ancora diversi interrogativi sulla comprensione delle interazioni che si creano tra i fattori che possono scatenare il collasso della colonia e in che modo questi influenzino la salute dell'ape.

Il presente lavoro di tesi punta ad analizzare i dettagli funzionali e molecolari dell'azione esercitata da alcuni importanti agenti di stress e delle loro interazioni, articolandosi in tre sezioni:

- ✓ Studio dell'impatto del DWV sulla risposta immunitaria dell'ape e sulla fitness della *Varroa* (capitolo III).
- ✓ Valutazione dell'effetto di diete differenziali sullo stato di benessere dell'ape e sulla sua capacità di rispondere a stress da intossicazione da insetticidi neonicotinoidi (capitolo IV).
- ✓ Analisi degli effetti di insetticidi neonicotinoidi sulla risposta immunitaria dell'ape e, attraverso studi *in vitro*, su linee cellulari di organismi superiori (capitolo V).

Poiché gli effetti indotti da questi agenti di stress alterano in modo diretto l'immunocompetenza dell'ape, si ritiene opportuno presentare in questa sezione

introduttiva una breve sintesi delle conoscenze sull'immunità degli insetti, con
particolare riferimento all'ape.

CAPITOLO II: L'IMMUNITA'

La modulazione della risposta immunitaria ha un ruolo fondamentale nella capacità delle api di far fronte ai diversi fattori di stress. I vertebrati si difendono attraverso l'azione del sistema immunitario, innato e acquisito. Il sistema immunitario innato consta di elementi capaci di riconoscere strutture molecolari conservate, presenti in diverse classi di patogeni, e innescare la risposta infiammatoria, che prevede processi quali fagocitosi o sintesi di peptidi ad azione antimicrobica (Akira *et al.*, 2006). L'immunità acquisita invece è mediata da cellule specializzate quali i linfociti che, grazie ai propri recettori di superficie, riconoscono specifici antigeni dei patogeni innescando una cascata di eventi che prevede, ad esempio, l'espansione clonale dei linfociti attivati e la produzione di anticorpi (Ochsenbein e Zinkernagel, 2000). Gli insetti mancano dell'immunità acquisita ma sono dotati di un complesso ed efficiente sistema immunitario innato ben sviluppato che comprende sia barriere fisiche che una complessa serie di reazioni di difesa cellulari e umorali, a cui si aggiungono risposte che coinvolgono l'intera colonia negli insetti sociali (immunità sociale). L'insieme di tutti questi fattori determina la capacità dell'organismo di resistere alle malattie, capacità che può essere empiricamente quantificata attraverso l'indice di Immuno-Competenza (Siva-Jothy *et al.*, 2005; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

2.1 L'immunità sociale

Il genoma degli insetti sociali presenta un minor numero di geni impegnati nella risposta immunitaria rispetto agli insetti solitari. Ad esempio il genoma delle api contiene il 66% in meno di geni coinvolti nella risposta immunitaria innata rispetto ai Ditteri e circa il 10-20% in meno rispetto a *Nasonia* (Evans *et al.*, 2006; Werren *et al.*, 2010). Tutto questo sembra piuttosto paradossale se si considera che proprio la socialità offre di per sé le condizioni ottimali per la diffusione di malattie e patogeni.

Evans ha cercato di dare un senso a queste osservazioni postulando diverse ipotesi. In primo luogo gli insetti sociali hanno un'immunità sociale/comportamentale (Evans e Spivak, 2010). Un esempio di immunità sociale

è l'attività di grooming, una sorta di pulitura-spulciamento, mediante il quale le api adulte rimuovono dal proprio corpo (auto-grooming) o da quello delle altre (allo-grooming) particelle estranee e parassiti (Boecking e Spivak, 1999). Si ritiene che il grooming sia un'importante componente ereditaria della resistenza (Arechavaleta-Velasco e Guzman-Novoa, 2001), un fondamentale meccanismo di difesa adottato ad esempio da *A. cerana* contro la *Varroa* (Rath, 1999). Uno dei classici esempi di immunità sociale delle api è inoltre il “comportamento igienico”, descritto per la prima volta da Rothenbuhler come la capacità delle api operaie di riconoscere ed allontanare dalla covata sana le larve malate o parassitizzate, evitando così la diffusione della malattia (Rothenbuhler, 1964). In aggiunta le api hanno evoluto meccanismi per mantenere costante l'ambiente all'interno del nido, riscaldandolo, raffreddandolo o ventilandolo a seconda delle necessità (Seeley e Visscher, 1985). E' stato inoltre osservato che esse sono in grado di generare una sorta di febbre dell'alveare in risposta a un'infezione diffusa da patogeni termo-sensibili quali l'*Ascosphaera apis* (Starks *et al.*, 2000). Un altro esempio di immunità sociale nelle api è l'utilizzo di sostanze quali resine per la costruzione del nido che permettono di creare un ambiente impermeabile, privo di fessure che possano determinare l'ingresso di luce o vento. Di fondamentale importanza per la difesa della colonia sembra essere inoltre la costruzione di celle per la covata rivestite da propoli, sostanza a nota azione antimicrobica (Simone-Finmstrom e Spivak, 2010).

Tutti questi comportamenti potrebbero esporre gli insetti sociali all'azione di un minor numero di agenti patogeni rispetto agli individui solitari e rendere superflui alcuni dei canonici pathway propri della risposta immunitaria innata (Harpur e Zayed, 2013).

2.2 Le barriere fisiche

La prima linea di difesa nelle api, così come negli altri insetti, è rappresentata dal rivestimento del corpo. Esso è costituito dalla cuticola dell'esoscheletro, dal rivestimento delle trachee e dalla membrana peritrofica dell'intestino. Le trachee e

l'intestino, che rappresentano possibili vie d'ingresso dei patogeni, sono rivestite da una matrice chitinoso che conferisce loro una maggiore resistenza (Siva-Jothy *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la cuticola dell'esoscheletro, essa è una complessa struttura multifunzionale: non solo supporta l'insetto, determinandone la forma, offrendo superfici di attacco per i muscoli e limitando la perdita di acqua, ma può fungere anche da barriera all'ingresso dei patogeni o delle sostanze tossiche ed essere coinvolta nella comunicazione chimica (Vincent e Wegst, 2004). Essa è costituita principalmente da catene polisaccaridiche di chitina, imballate in una matrice di proteine e lipidi. Queste si dispongono a formare una struttura a più strati: la procuticola, formata a sua volta dall'endocuticola e dall'esocuticola, e l'epicuticola più esterna, spesso mancante di chitina ma caratterizzata dall'abbondante presenza di idrocarburi cuticolari strettamente associati ai lipidi (Andersen *et al.*, 1994). Questi sono sintetizzati dagli enociti, cellule specializzate che nelle api operaie sono in stretta associazione con il fat body al di sotto dell'epitelio, più frequentemente vicino agli sterniti che ai tergiti (Ruvolo e Landim, 1993). Dopo la sintesi e il rilascio da parte degli enociti, gli idrocarburi cuticolari sono trasportati attraverso l'emolinfa dalle lipoporine e raggiungono la superficie dell'insetto tramite i pori della cuticola dell'esoscheletro, dove integrano lo sviluppo dello strato più esterno (Blomquist e Dillwith, 1985). Gli idrocarburi cuticolari sono escreti da molti insetti per riconoscere e identificare gli individui presenti nelle loro vicinanze (Blomquist e Bagnères, 2010). Negli insetti sociali tali idrocarburi sono specie-specifici (ad esempio le formiche, Martin e Drijfhout, 2009; le api, Buckner *et al.* 2009; le vespe, Turillazzi *et al.*, 2004) e colonia-specifici (ad esempio le formiche, Martin *et al.*, 2013; le api, Buchwald e Breed 2005), con membri della colonia capaci di riconoscere tramite questi i potenziali invasori. Molti parassiti hanno però sviluppato diverse strategie per eludere questo sistema di riconoscimento chimico, attraverso l'imitazione dell'odore dell'ospite o mediante una riduzione dell'espressione dei propri idrocarburi cuticolari a livelli non rilevabili (Lorenzi e Bagnères 2002; Kroiss *et al.*, 2009). Anche la *Varroa* ha adottato questa strategia ed è in grado di camuffare la sua presenza imitando l'odore dell'ospite, non attraverso la sintesi degli idrocarburi cuticolari ma attraverso un rapido trasferimento passivo di questi dall'ape all'acaro (Kather *et al.*, 2015). Nelle api sono state osservate variazioni

quantitative nel profilo degli idrocarburi cuticolari durante il passaggio da nutrici a foraggiere e proprio questo sembra giocare un ruolo importante nella preferenza della *Varroa* per le api nutrici, che permettono all'acaro di raggiungere la covata, piuttosto che per le foraggiere (Del Piccolo *et al.*, 2010). Numerosi sono gli studi che mostrano come gli idrocarburi cuticolari possano subire variazioni qualitative e quantitative non solo a seconda dello stadio di sviluppo dell'ape ma anche in base al suo stato fisiologico o in seguito a cambiamenti dell'ambiente (Howard e Blomquist 2005; Blomquist e Bagnères, 2010), suggerendo che essi potrebbero essere alterati anche in seguito all'attivazione di processi immunitari. Stimolando ad esempio la risposta immunitaria delle api mediante iniezione di un'endotossina batterica, l'LPS, è stato osservato un'effettivo cambiamento nel profilo degli idrocarburi cuticolari, in particolare a carico degli alcheni, accompagnato da un cambiamento significativo nelle interazioni sociali tra gli individui infetti e quelli sani (Richard *et al.*, 2008). Variazioni nel comportamento tra questi due gruppi si osservano inoltre ricoprendo gli individui sani con estratti contenenti idrocarburi secreti da api immuno-stimolante (Richard *et al.*, 2008). Anche l'immunostimolazione di api adulte mediante *E. coli* determina variazioni dei profili chimici degli idrocarburi cuticolari accompagnati da cambiamenti nell'espressione di centinaia di geni, alcuni dei quali non associati ai canonici pathway immunitari (Richard *et al.*, 2012). Variazioni nel profilo degli idrocarburi cuticolari sono state inoltre riscontrate in api infette da DWV (Baracchi *et al.*, 2012), così come in api infestate da *Varroa* e *Nosema*, anche se in questo caso non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nel comportamento delle api malate, così come sono apparse inalterate le interazioni sociali tra queste e le api sane (McDonnell *et al.*, 2013).

2.3 L'immunità cellulare

La risposta immunitaria cellulo-mediata coinvolge processi quali fagocitosi, nodulazione e incapsulamento, spesso accompagnati da reazioni di

melanizzazione. Tali eventi sono mediati dall'azione delle "cellule del sangue", gli emociti (Gillespie *et al.*, 1997).

Negli insetti distinguiamo diversi tipi di cellule emocitarie, identificate in base a caratteristiche morfologiche, chimiche e funzionali e, sebbene svolgano simili funzioni, in alcuni casi si osservano differenze di nomenclatura tra le varie specie (Strand, 2008).

In *Drosophila* gli emociti si classificano in plasmotociti, deputati all'allontanamento dei microrganismi e delle cellule apoptotiche, lamellociti, che incapsulano i grossi invasori, e crystal cell, coinvolte nei processi di melanizzazione (Meister e Lagueux, 2003).

Nella maggior parte degli ordini di insetti, incluso *Lepidoptera*, *Diptera* e *Hymenoptera*, distinguiamo, oltre ai plasmotociti, i proemociti, i granulociti, gli sferulociti e gli enocitoidi (Lavine e Strand, 2002). Nelle larve dei lepidotteri i granulociti e i plasmotociti rappresentano più del 50% delle cellule in circolo e sono le uniche capaci di aderire alla superficie della particella estranea (Stoepler *et al.*, 2013). Si ritiene che gli sferulociti siano impegnati nel trasporto dei componenti cuticolari attraverso l'emolinfa (Sass *et al.*, 1994), mentre gli enocitoidi contengano i precursori citoplasmatici delle fenolossidasi, coinvolti nei processi di melanizzazione (Jiang *et al.*, 1997). Si ipotizza invece che i proemociti siano cellule staminali in circolo in grado di differenziarsi nei diversi tipi di cellule emocitarie (Lavine e Strand, 2002).

Utilizzando in combinazione la citometria a flusso e dati di microscopia, il team guidato da Marringa ha recentemente fornito ulteriori informazioni circa la popolazione di cellule evidenziabili nell'emolinfa delle api. In particolare, attraverso un confronto con i Ditteri, i Lepidotteri e altri membri appartenenti all'ordine degli Imenotteri, sono state evidenziate nell'emolinfa delle api cellule permeabilizzate, plasmotociti e particelle prive di nucleo, simili a microparticelle o protusioni delle membrane, mai descritte prima in tali insetti (Marringa *et al.*, 2014). In particolare tali particelle sembrano comportarsi come una popolazione dinamica, con differenze non solo tra i membri di colonie differenti ma anche tra i singoli componenti di un alveare. Questo farebbe ipotizzare che sia un diverso stato fisiologico che l'azione di diversi stimoli, quali agenti patogeni o xenobionti,

possano determinare cambiamenti a carico degli emociti presenti in circolo (Marringa *et al.*, 2014).

La conta degli emociti totali può essere considerata una misura indiretta della capacità dell'insetto di rispondere agli attacchi e quindi contribuisce a determinare l'indice di Immuno-Competenza (Wilson *et al.*, 2002). E' interessante notare che il numero di emociti cambia a seconda dello stadio di sviluppo delle api. E' stato infatti osservato che le larve e le pupe, che crescono all'interno della cella e non possono adottare strategie comportamentali per difendersi dall'azione dei patogeni, presentano un maggior numero di emociti rispetto agli adulti (Wilson-Rich *et al.*, 2008). Inoltre si assiste a un'ulteriore riduzione del numero di tali cellule nel passaggio da nutrici a bottinatrici, il che determinerebbe una riduzione nella capacità dell'insetto di difendersi attraverso una risposta immunitaria cellulo-mediata (Omholt e Amdam, 2004).

2.3.1 La fagocitosi

La fagocitosi è una risposta cellulare evolutivamente conservata nei vari *phyla* di eucarioti e in alcuni organismi unicellulari, quali le amebe, permette la creazione di nuove relazioni endosimbiontiche (Yutin *et al.*, 2009). Essa è definita come il processo mediante il quale vengono internalizzate particelle con un diametro maggiore di 0,4 μm (Haas, 2007). La fagocitosi assolve a diverse funzioni: da mezzo di nutrimento negli organismi unicellulari (Pereira-Neves e Benchimol, 2007) a meccanismo di rimozione delle cellule apoptotiche (Reddien e Horvitz, 2004), da sistema di rimodellamento dei tessuti nel corso dell'embriogenesi (Zhou *et al.*, 1995) a elemento cardine della risposta immunitaria (Stuart e Ezekowitz, 2008). La fagocitosi è un processo che prevede una cascata di eventi in successione, primo tra tutti il riconoscimento della particella da inglobare. Questa fase in *Drosophila* è mediata da fattori solubili e recettori legati alla membrana degli emociti, le proteine PRRs (Ramen *et al.*, 2002). Una volta avvenuto il riconoscimento, si assiste ad un rimodellamento del citoscheletro della cellula emocitaria e la particella bersaglio viene rapidamente circondata dagli pseudopodi e inglobata in una vescicola intracellulare, derivante dalla membrana plasmatica,

che prende il nome di fagosoma. Questa si fonde con i lisosomi formando un fagolisosoma al cui interno si ha la distruzione della particella mediante l'azione degli enzimi lisosomiali, delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) (Siva-Jothy *et al.*, 2005).

Mentre nei mammiferi la fagocitosi è soprattutto a carico dei macrofagi, negli insetti i principali elementi coinvolti in questo processo sono i plasmotociti e i granulociti (Lamprou *et al.*, 2007). In *Manduca sexta* i plasmotociti inglobano microsfele iniettate nell'emocele, mentre i granulociti fagocitano maggiormente le cellule in apoptosi (Ling e Yu, 2005). E' stato inoltre osservato che l'efficienza e la velocità della fagocitosi varia a seconda della particella da inglobare: ad esempio *E. coli* viene fagocitato più rapidamente di *S.aureus* in *A.gambiae* e in linee cellulari di drosophila (Lamprou *et al.*, 2007; Moita *et al.*, 2006). Questo suggerisce che negli insetti la fagocitosi, che è particolarmente importante nel corso delle infezioni batteriche, può essere mediata da distinti meccanismi molecolari (Marmaras e Lampropoulou, 2009).

2.3.2 L'incapsulamento e la nodulazione

Un altro meccanismo di risposta cellulare, che le cellule emocitarie mettono in atto sia quando la cuticola è perforata da un corpo estraneo che per eliminare bersagli troppo grandi per essere fagocitati (come nel caso di parassiti, protozoi e funghi), è l'incapsulamento (Wilson *et al.*, 2002). Un tipico esempio di incapsulamento si può osservare quando le vespe parassitoidi depongono le uova nell'emocele delle larve di drosophila (Fig. 2.1).



Figura 2.1 - Esempio di incapsulamento. Incapsulamento dell'uovo dell'imenottero parassitoide *Leptopilina boulardi* nell'ospite *Drosophila melanogaster* (Ottaviani, 2005).

L'incapsulamento è costituito da una serie di fasi che coinvolgono in particolare i plasmotociti, che avvertono la presenza del corpo estraneo nell'emocele, e i lamellociti (Lavine e Strand, 2002; Ottaviani, 2005). I plasmotociti, riconoscendo il corpo estraneo, si attaccano ad esso e subiscono un rimodellamento della propria struttura, emettendo una complessa rete di fillopodi. Entro poche ore dall'infestazione viene indotta una massiva produzione di emociti a livello degli organi ematopoietici con conseguente incremento del numero di lamellociti. Questi iniziano a costruire intorno all'uovo del parassitoide una serie di strati cellulari, andando a formare la capsula emocitaria. In questa alla fine riversano il proprio contenuto citoplasmatico, che comprende tra l'altro le fenoloossidasi che permettono l'avvio della melanizzazione. All'interno della capsula il parassita viene ucciso per produzione locale di radicali citotossici, quali ROS e RNS, o per asfissia (Nappi *et al.*, 1995; Nappi e Ottaviani, 2000). I parassiti hanno però sviluppato meccanismi per eludere le reazioni di incapsulamento ad esempio mediante l'iniezione di fattori di virulenza capaci di sopprimere il sistema immunitario dell'ospite, garantendo così lo sviluppo dell'endoparassita immaturo (Pennacchio e Strand, 2006). L'efficienza di incapsulamento varia tra le varie specie e tra gli individui di una stessa specie: studi sui bombi hanno ad esempio evidenziato che i maschi presentano una meno intensa risposta legata all'incapsulamento rispetto alle operaie (Baer e Schmid-Hempel, 2006). Nelle api

l'incapsulamento può essere indotto attraverso l'uso di un filo di nylon che permette di mimare il comportamento della *Varroa* (Sammataro *et al.*, 2000). Proprio in questo modo è stato dimostrato che, nonostante con l'avanzare dello sviluppo vi sia una riduzione del numero totale di emociti presenti in circolo, la risposta di incapsulamento rimane invece stabile (Wilson-Rich *et al.*, 2008).

La reazione di nodulazione, infine, è molto simile a quella di incapsulamento in quanto, nel corso della formazione del nodulo, gli emociti si aggregano, circondando la particella estranea. I noduli, una volta formati, possono attaccarsi ai tessuti o essere a loro volta incapsulati (Vilmos e va Kurucz, 1998). La nodulazione, così come l'incapsulamento, è generalmente accompagnata da reazioni di melanizzazione catalizzate dalla fenolossodasi (Soderhall e Cerenius, 1998).

2.4 L'immunità umorale

L'altra componente della risposta immunitaria innata negli insetti è quella umorale, che lavora a stretto contatto e spesso sovrapponendosi alla risposta cellulare per combattere gli agenti patogeni e garantire la sopravvivenza dell'organismo (Lavine e Strand, 2002).

Le difese umorali includono la produzione dei ROS, l'innesco di cascate enzimatiche, che regolano la coagulazione e la melanizzazione dell'emolinfa, e la sintesi di peptidi antimicrobici, mediante l'attivazione di specifiche vie di segnalazione, quali Toll e Imd.

2.4.1 La produzione dei ROS

In seguito a infezione batterica, la drosophila è in grado di indurre la sintesi dei ROS, a livello delle cellule dell'intestino, mediante un ciclo in cui la rapida sintesi ed eliminazione di tali radicali sembra essere vitale. Le proteine DUOX

costituiscono una famiglia conservata di molecole che contengono, oltre al dominio NADPH, un dominio perossidasi (PHD) all'N-terminale in grado di produrre ROS mediante la conversione del perossido di idrogeno (H_2O_2) in acido ipocloroso (HOCl), un potente microbicide (Ritsick *et al.*, 2004). L'eccessiva produzione dei ROS, che sarebbe altamente deleteria per l'insetto, è impedita grazie all'Immune Responsive Catalase (IRC) che, lavorando in stretta associazione con le proteine DUOX, crea quell'equilibrio fondamentale per il controllo dei microrganismi a livello del lume intestinale (Lemaitre e Hoffmann, 2007).

2.4.2 Le cascate enzimatiche

2.4.2.1 La coagulazione

La coagulazione è la formazione di un'insolubile matrice all'interno del sangue o dell'emolinfa che frena l'emorragia (emostasi), contribuendo alla chiusura della ferita e proteggendo l'organismo dallo sviluppo di infezioni (Dushay, 2009). Gli artropodi, che hanno un sistema circolatorio aperto, fanno un maggiore uso dei processi di coagulazione rispetto ai vertebrati, che potrebbero andare facilmente incontro a fenomeni di trombosi, e di conseguenza a danni ischemici e morte (Theopold *et al.*, 2002). È interessante notare che il meccanismo con cui si realizza la formazione del coagulo varia tra le varie specie di insetti, così come tra le diverse fasi di sviluppo all'interno della stessa specie (Dushay, 2009). Gli emociti dello scarafaggio *Leucophaea maderae*, in seguito a ferita, secernono una transglutaminasi calcio dipendente che catalizza la polimerizzazione delle lipoproteine e di proteine simili alla vitellogenina (Tsakas e Marmaras, 2010). Il meccanismo di coagulazione più caratterizzato è però quello del *Lymulus polyphemus*, che sembra essere molto simile a quello studiato in *Drosophila* (Vimlos e Kurucz, 1998). Secondo questo, l'LPS e il β -1,3-glucano innescano l'attivazione di reazioni a catena a carico delle serin-proteasi, che culminano con la formazione del coagulo, l'attivazione della profenolossidasi (proPO) e dei processi di melanizzazione (Vimlos e Kurucz, 1998). Negli ultimi anni sono stati messi in luce nuovi importanti aspetti di questo processo, che assume ancora di più un

fondamentale ruolo nella difesa dell'organismo (Theopold *et al.*, 2004). E' stato infatti osservato che il coagulo si forma non solo per bloccare le ferite, ma anche in seguito all'esposizione a particelle estranee. Esso riduce la diffusione delle particelle non-self all'interno del corpo impedendo, quindi, la diffusione del patogeno e favorendo la localizzazione della risposta umorale e cellulare a livello della zona interessata (Haine *et al.*, 2006).

2.4.2.2 La melanizzazione

La melanizzazione rappresenta una rapida risposta del sistema immunitario coinvolta in diversi meccanismi di difesa dell'insetto, come l'incapsulamento e la nodulazione, la coagulazione, la fagocitosi e l'espressione dei peptidi antimicrobici (Cerenius *et al.*, 2008). Una volta formata, la melanina si deposita intorno ai microrganismi invasori, favorendo la localizzazione di questi a livello del sito d'ingresso (Tang, 2009). Si pensa inoltre che le sostanze chinoniche e i ROS, formatesi come intermedi durante la sintesi di melanina, abbiano una potenziale azione citotossica sia contro i microrganismi che contro l'ospite (Christensen *et al.*, 2005). Un'enzima chiave nella sintesi di melanina è la fenolossidasi (PO), sintetizzata in forma di zimogeno (pro-fenolossidasi o PPO) da diversi tipi di cellule emocitarie, quali le crystal cell e i lamellociti (Irving *et al.*, 2005). Il riconoscimento di agenti patogeni e/o lesioni porta all'attivazione di una serie di serin-proteasi, con conseguente taglio proteolitico del PPO inattivo e formazione della PO attiva, che catalizza la formazione di composti fenolici e chinoni (Tang, 2009). Considerando l'alta tossicità degli intermedi della melanina, è fondamentale che tale processo sia fortemente regolato. Una forma di regolazione è data dalle proteine serpine, inibitori delle serin-proteasi, capaci di limitare la melanizzazione al solo sito di lesione o infezione (Cerenius *et al.*, 2008). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che nei Lepidotteri un ruolo fondamentale nel processo di melanizzazione è rivestito da una proteina nota come 102, secreta dalle cellule emocitarie, capace di formare uno strato di fibre amiloidi intorno al corpo estraneo (Fig. 2.2). Queste fibre creano una sorta di impalcatura in grado di circoscrivere la melanizzazione nel solo sito d'azione

(Falabella *et al.*, 2012; Di Lelio *et al.*, 2014), impedendo la diffusione dei precursori tossici della melanina al di fuori del sito d'interesse.

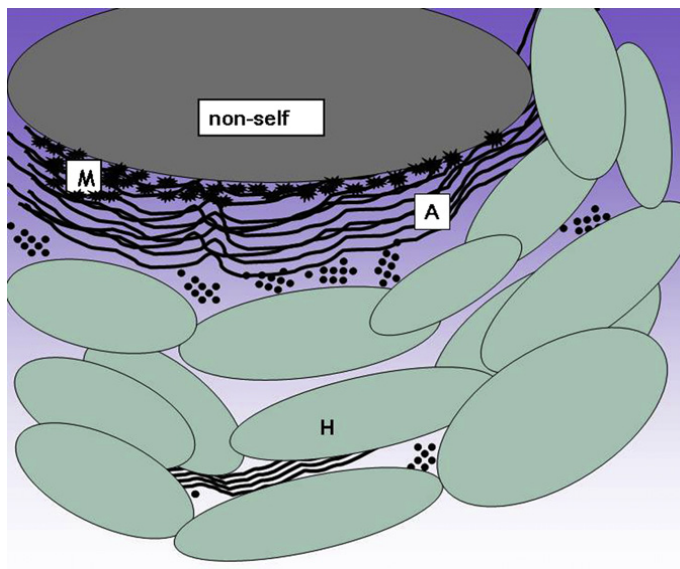


Figura 2.2 - Modello di melanogenesi localizzata. Il riconoscimento della superficie non-self porta alla degranulazione degli emociti [H] e alla formazione di fibre amiloidi [A] che bloccano la melanina [M] e ogni suo precursore, che così non diffondono al di fuori del sito di biosintesi (Falabella *et al.*, 2012).

2.4.3 I peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (AMP) sono i principali effettori della risposta immunitaria umorale contro l'invasione dei patogeni. Gli AMP sono peptidi, generalmente cationici, che nell'emolinfa possono raggiungere concentrazioni molto elevate, fino a 300 μ M (Meister *et al.*, 2000). Il principale sito di produzione di questi è il fat body (Fehlbaum *et al.*, 1994). Esso si forma dal mesoderma durante l'embriogenesi e già dal primo stadio larvale acquista un ruolo chiave nella difesa immunitaria. Nella produzione di AMP possono essere inoltre coinvolte anche altre cellule quali gli emociti (Boman, 1991), le cellule dell'epitelio cuticolare (Brey *et al.*, 1993) e dal tratto riproduttivo (Rosetto *et al.*, 1996), le ghiandole salivari e cellule del tratto digerente (Kylsten *et al.*, 1992).

Negli insetti sono stati identificati più di 170 AMP che in base alla sequenza e alle caratteristiche strutturali possono essere suddivisi in 3 grossi gruppi (Ottaviani, 2005):

- ✓ Peptidi lineari che formano alfa eliche e sono privi di residui di cisteina;
- ✓ Peptidi ciclici contenenti residui di cisteina;
- ✓ Peptidi caratterizzati da un alto contenuto di residui di prolina e/o glicina.

In drosophila sono stati distinti diversi tipi di AMP. Un esempio è la defensina, AMP ricco di cisteina, che presenta un potente effetto litico su un ampio spettro di batteri Gram-positivi. Essa è stata individuata nei Ditteri, negli Imenotteri, nei Lepidotteri, nei Coleotteri, nei Tricotteri, negli Emitteri e negli Odonati (Ottaviani, 2005). Ricordiamo inoltre la diptericina, peptide antibatterico trovato solo nei Ditteri e prodotto in seguito a infezione da batteri Gram-negativi, e la cecoprina, isolata per la prima volta in *H. cecropia*. Quest'ultima è prodotta in risposta al danno settico legato sia a batteri Gram-positivi che Gram-negativi ed è in grado di influire sulla proliferazione cellulare, inibendo la sintesi delle proteine della membrana (Tsakas e Marmaras, 2010).

Nelle api sono stati identificati meno AMP rispetto a quelli trovati in drosophila. Questi includono due defensine, l'abaicina, l'apidaecina, l'apisina e l'imenottericina (Evans *et al.*, 2006). La defensina è rappresentata da due peptidi, defensina 1 e 2, con una massa molecolare di 5,5 e 4,8 kDa, codificate dal gene defensina 1 e defensina 2 (Ilyasov *et al.*, 2013). Studi di RT-PCR hanno evidenziato che la defensina 1 è espressa anche a livello delle ghiandole toraciche, ipofaringee e mandibolari e da queste è secreta nella pappa reale e nel miele (Kwakman *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2008). Di conseguenza la defensina 1 non partecipa solo ai processi di immunità individuale ma è anche coinvolta nell'immunità sociale (Ilyasov *et al.*, 2013). Le defensine hanno un ampio spettro d'azione; hanno un'attività citotossica contro i batteri Gram-positivi e alcuni Gram-negativi, funghi e protisti (Ilyasov *et al.*, 2013). E' stato inoltre dimostrato che in seguito ad infezioni da ectoparassiti, quali la *Varroa*, vi è una riduzione nella produzione di defensina, verosimilmente associata all'azione immunosoppressiva indotta dal DWV (Yang *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2005). L'abaicina, lunga 34 amminoacidi, mostra una sequenza simile a quelle

dell'apidaecina (delle api) e alla diptericina (delle mosche). Essa svolge la sua azione antimicrobica permeabilizzando la membrana lipidica dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Casteels *et al.*, 1990). L'apidaecina è lunga 18 amminoacidi, ricca di residui di prolina, e agisce soprattutto sui batteri Gram-negativi, legandosi prima alla parete batterica per poi invadere lo spazio periplasmatico (Li Ma *et al.*, 2006). L'imenopterina è lunga 93 residui amminoacidici e agisce sia sui batteri Gram-positivi che Gram-negativi, permeabilizzando prima la membrana batterica esterna e poi quella interna (Casteels *et al.*, 1993). Infine, l'apisimina è un peptide lungo 54 amminoacidi ritrovato in particolar modo nella pappa reale (Bilíková *et al.*, 2002).

2.4.4 L'immuno-attivazione

Così come nella risposta immunitaria innata dei mammiferi, i componenti delle pareti delle cellule microbiche rappresentano i principali agonisti capaci di attivare la risposta immunitaria umorale degli insetti. L'innesco è dato infatti dal riconoscimento dell'intruso mediante recettori quali i Pattern Recognition Receptors (o PRRs), che riconoscono motivi molecolari associati ai patogeni, noti come Pathogen Associated Molecular patterns o PAMPs, quali i lipopolisaccaridi (LPS), i peptidoglicani (PGN) e i beta-1,3 glicani (Girardin e Philpott, 2004). In particolare i PGN sono i principali componenti della parete cellulare della maggior parte dei batteri. Questi polimeri sono costituiti da lunghe catene di zuccheri in cui si alternano residui di N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), connesse da corti ponti peptidici. Nella maggior parte dei batteri Gram-negativi al gruppo carbossilico del NAM sono legati 4 amminoacidi: L-Alanina, acido D-Glutammico, acido diaminopimelico (DAP) e D-Alanina, mentre nei Gram-positivi vi è la sostituzione del DAP con l'L-Lisina (Schleifer e Kandler, 1972). Il pathway Toll ha recettori capaci di riconoscere i PGN che presentano residui di L-lisina, mentre la via di segnalazione Imd è dotata di recettori attivati da PGN con DAP (Leulier *et al.*, 2003). La distinzione tra le due vie di segnalazione non è però così netta; vi sono ad esempio PGN con residui di DAP capaci di attivare non solo Imd ma anche il pathway Toll, anche se solo debolmente (Leone *et al.*, 2008). Il riconoscimento dei PGN dei batteri Gram-

negativi (DAPI-type PGN) nella via di segnalazione Imd è affidato principalmente alla proteina transmembrana PGRP-LC e al recettore citoplasmatico PGRP-LE (Takehana *et al.*, 2002). Il riconoscimento dei PGN contenenti residui di lisina è invece affidato a recettori solubili quali PGRP-SA, PGRP-SD e GNB1 (Michel *et al.*, 2001). In particolare è stato ipotizzato che GNB1 idrolizzi i PGN presenti sulla superficie batterica in piccoli frammenti suscettibili al riconoscimento da parte di PGRP-SA (Wang *et al.* 2006).

Particolari PRR, note come “Gram-negative binding proteins” o GNB, sono invece capaci di riconoscere i glucani dei funghi e dei lieviti. Di particolare importanza è soprattutto la proteina GNB3, che funge da potente attivatore della via di segnalazione Toll in caso di attacco da funghi entomopatogeni (Hetru e Hoffmann, 2009).

2.4.5 Il pathway Toll

Negli insetti i recettori Toll o Toll-like (TLR) sono un'importante classe di proteine transmembrana, ortologhi ai recettori TLR dei mammiferi, che giocano un ruolo critico sia nello sviluppo che nei processi immunitari (Beutler, 2004). Tali recettori sono caratterizzati dalla presenza di un dominio extracellulare, ricco di motivi di leucina, e un dominio intracellulare Toll Interleukin Resistance signaling (TIR), trovato anche in altri tipi di proteine coinvolte nella segnalazione, quali la proteina adattatrice Myd88 (Aronstein e Salvidar, 2005). Dopo il riconoscimento dei patogeni da parte dei PRRs, vi è l'innesco di una cascata di proteasi che determina la formazione del ligando Spaetzle (Spz) funzionale che attiva il pathway Toll che, a sua volta, porta alla sintesi di alcuni AMP, all'attivazione dei lisozimi e di elementi coinvolti nella melanizzazione. La proteina Spz è sintetizzata e secreta dagli emociti sotto forma di precursore inattivo con un pro-dominio di 22 kDa che maschera la regione C-terminale. Lo stimolo immunitario attiva una cascata di proteasi che tagliano Spz che, in seguito a cambiamento conformazionale, espone i siti di legame per il recettore Toll (Arnot *et al.*, 2010). Nel genoma di *Drosophila* sono stati identificati 9 geni che codificano per i recettori Toll e 6 per le proteine Spz (Parker *et al.*, 2001). Nel

genoma dell'ape sono stati evidenziati due possibili ortologhi di Spz (GB15688 e GB13503), anche se non è ancora chiaro quale dei due agisca come citochina legandosi a Toll (Evans *et al.*, 2006). In drosophila il recettore Toll attivo si lega attraverso il dominio TIR alla proteina MyD88, che è dotata anche di un “*death domain*” (DD). Grazie a questo dominio essa forma un complesso eterotrimerico con la proteina Tube e la chinasi Pelle, che determinano la fosforilazione e la degradazione della proteina Cactus (Fig. 2.3) (Sun *et al.*, 2002). Cactus funge da proteina IκB, sequestrando a livello del citoplasma 2 fattori NF-κB, dorsal e dorsal-related immune factor (Dif) (Royet *et al.*, 2005). Non è comunque ancora chiaro se Pelle direttamente fosforili Cactus o se siano coinvolte altre proteine intermedie. Nell'ape sono stati trovati due omologhi di dorsal, dorsal-1|GB19066 e dorsal-2|GB18032.

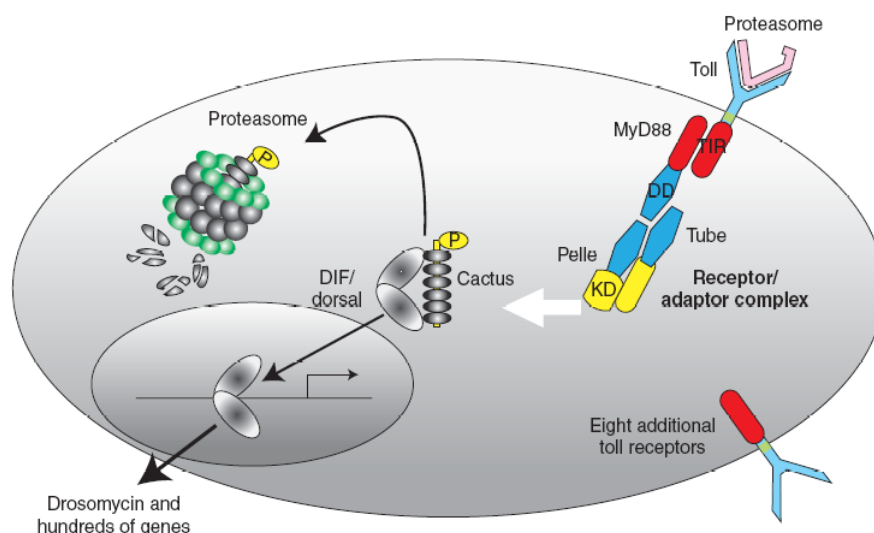


Figura 2.3 - Pathway Toll in drosophila. L'attivazione di Toll determina la degradazione di Cactus e la successiva localizzazione nucleare delle proteine NF-κB, dorsal e dif. Questi fattori di trascrizione si legano ai promotori dei geni bersaglio, come ad esempio la drosomicina, attivando la loro trascrizione (Hetru e Hoffmann, 2009).

2.4.6 Il pathway Imd

I batteri Gram-negativi inducono la sintesi di AMP attraverso l'attivazione del pathway Imd (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Aggarwal e Silverman, 2008). A differenza di Toll, la via di segnalazione Imd è specifica della risposta immunitaria e gioca comunque un ruolo chiave nel garantire la sopravvivenza

dell'organismo (Lemaitre *et al.*, 1995). Questo pathway è stato inizialmente identificato attraverso una mutazione, un'immunodeficienza (Imd), capace di compromettere l'espressione di geni coinvolti nella sintesi di AMP (Lemaitre e Hoffmann, 2007). Mentre l'attivazione del pathway Toll dipende dall'interazione dei ligandi microbici con proteine circolanti, la via di segnalazione Imd è innescata dal diretto contatto dei PGN della parete dei batteri Gram-negativi con la proteina transmembrana PGRP-LC (Choe *et al.*, 2005). PGRP-LC è una proteina di membrana di 55 kDa costituita da un dominio extracitoplasmatico, deputato al riconoscimento dei PGN, e un dominio di segnalazione intracitoplasmatico. L'attivazione del recettore induce la sua dimerizzazione o oligomerizzazione e il reclutamento della proteina Imd, che è dotata del cosiddetto dominio di morte (Lemaitre *et al.*, 1995). Lo stesso dominio è posseduto dalla proteina FADD (Fas-associated death domain) e dalla caspasi Dredd che vengono attivate di seguito nella segnalazione. Attraverso un meccanismo non del tutto noto, vi è l'attivazione della MAP 3 chinasi TAK1 (Zhou *et al.*, 2005), che a sua volta attiva una IKK che fosforila Relish su specifici residui di serina (Erturk-Hasdemir *et al.*, 2009). E' inoltre probabile che Relish subisca un taglio proteolitico mediato dalla stessa proteina Dredd. Successivamente, Relish trasloca nel nucleo dove si lega agli elementi di risposta inducendo l'espressione dei geni codificanti gli AMP (Fig. 2.4) (Hetru e Hoffmann, 2009). Si ritiene che il pathway Imd delle api sia molto simile a quello di drosophila, con ortologi per ciascuno dei suoi componenti (Evans *et al.*, 2006). Anche in ape, quindi, Imd è responsabile della produzione di AMP, oltre che di fattori coinvolti nella melanizzazione e nei processi apoptodici (Lemaitre e Hoffmann, 2007).

Il pathway Imd, oltre ad attivare Relish, determina, attraverso la proteina TAK1, anche l'attivazione di componenti del pathway delle jun chinasi (JNK) (Boutros *et al.*, 2002). Nel genoma delle api sono stati individuati ortologi anche dei principali componenti della via di segnalazione delle JNK (Evans *et al.*, 2006) e recenti studi indicano che questa via di segnalazione fornisce un feedback sia positivo che negativo per l'espressione degli AMP (Wojda *et al.*, 2004).

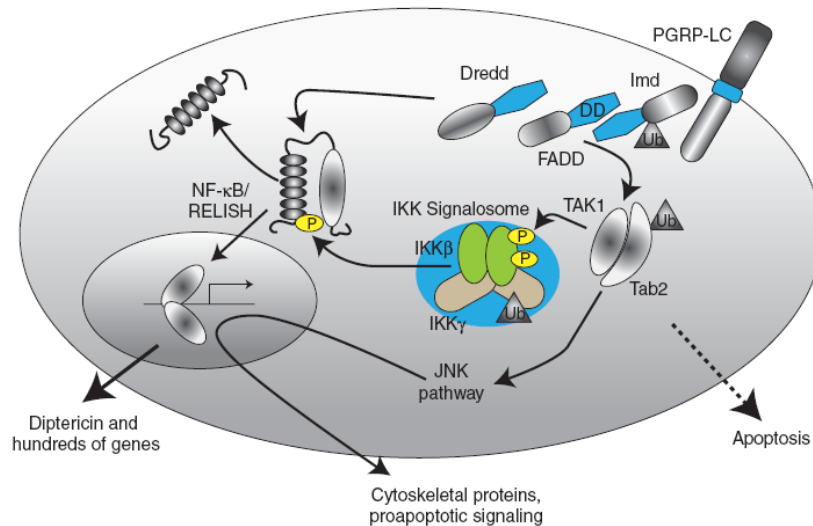


Figura 2.4. - Pathway Imd in drosophila La proteina attivata dal pathway Imd, Relish, determina la trascrizione degli AMP, quali la diptericina (Hetru e Hoffmann, 2009).

2.4.7 Il pathway JAK/STAT

Negli insetti possiamo ricordare un ulteriore pathway di segnalazione, JAK/STAT, inizialmente associato ai processi di sviluppo embrionale, ma che recentemente è stato studiato anche per il suo coinvolgimento nella risposta immunitaria innata (Agaïsse e Perrimon, 2004). Il pathway JAK/STAT si basa essenzialmente su tre fattori: il recettore Domeless, la chinasi Janus (JAK) e il fattore di trascrizione STAT (Lemaitre e Hoffmann, 2007). In drosophila l'infezione batterica induce gli emociti a rilasciare la citochina attiva Upd che agisce come ligando del recettore Domeless, attivando la via di segnalazione che culmina con la traslocazione di STAT nel nucleo (Agaïsse *et al.*, 2003). Tale segnalazione sembra promuovere la proliferazione degli emociti e svolgere inoltre un ruolo attivo nella difesa antivirale (Agaïsse e Perrimon 2004; Dostert *et al.* 2005). Il meccanismo di funzionamento di questo pathway è conservato tra le diverse specie di insetti ed appare identico fra le api e la drosophila. Nelle api sono stati infatti individuati omologhi del pathway JAK/STAT quali il recettore Domeless, la tirosina chinasi JAK (Hopscotch) e il fattore di trascrizione STAT92E (Evans *et al.*, 2006).

2.5 L'RNA interference

Mentre le infezioni batteriche e fungine sono combattute grazie all'azione dei pathway Toll o Imd, o mediante l'attivazione delle altre risposte immunitarie precedentemente descritte, l'immunità innata degli insetti affronta le infezioni virali essenzialmente attraverso la via dell'RNA interference (RNAi) (Kemp e Imler, 2009). Ad oggi il sistema di controllo dei patogeni virali non ha ricevuto un'adeguata attenzione, nonostante circa il 40% delle drosophile sia infetta da virus, che possono facilmente diffondersi mediante trasmissione orizzontalmente o verticalmente (Lemaitre e Hoffmann, 2007). L'RNAi è un meccanismo di regolazione post-trascrizionale, sequenza specifica, altamente conservato (Hammond *et al.*, 2001). Esso è anche un ottimo strumento di silenziamento genico che viene spesso utilizzato per comprendere la funzione di un gene in numerosi organismi, comprese le api a diverso stadio di sviluppo (Niu *et al.*, 2014). E' però emerso che l'efficacia del silenziamento è spesso gene-, dsRNA- e tessuto- specifica (Brutscher e Flenniken, 2015).

Durante il proprio ciclo di replicazione, il virus genera un RNA intermedio a doppio filamento (double strand RNA o dsRNA) che viene percepito come un segnale di pericolo da parte della cellula. Questa attraverso una ribonucleasi di tipo III, chiamata Dicer, scinde il dsRNA in piccoli frammenti di RNA a doppio filamento, lunghi 21-22 nucleotidi (short interfering RNA o siRNA). Questi vengono successivamente riconosciuti e legati dalla proteina Ago2, facente parte del complesso RISC (RNA-induced silencing complex). I filamenti dei siRNA vengono successivamente separati; il filamento senso viene degradato ad opera di Ago-2 e di C3PO; il filamento antisenso, noto come filamento guida, resta associato al complesso RISC, indirizzandolo così verso l'mRNA che presenta le sequenze nucleotidiche complementari e, legandosi a queste ultime, ne determina la degradazione (Winter *et al.*, 2009). Alcuni virus hanno però evoluto meccanismi per contrastare la difesa antivirale mediata dall'RNAi, ad esempio mediante l'espressione di specifici soppressori (VSR). Per esempio, "Flock house virus" produce la proteina B2 che lega il dsRNA, impedendo a Dicer-2 di separare i due filamenti (Lingel *et al.*, 2005).

Studi condotti in campo e in laboratorio, in particolare in *A. mellifera* e in *A. cerana*, indicano che la risposta antivirale mediata dall'RNAi rappresenta un importante componente di difesa delle api (Niu *et al.*, 2014). Ad esempio il trattamento con dsRNA contro il IAPV in api infette da tale virus riduce il titolo virale, suggerendo che questi insetti possiedono i macchinari necessari per mettere in campo una risposta antivirale basata sull'RNAi (Hunter *et al.*, 2010). Alimentando le larve con dsRNA DWV prima dell'infezione con tale virus, si è osservata una riduzione del titolo virale e della comparsa delle ali deformi, così come l'alimentazione degli adulti con tale dsRNA prima dell'inoculo del DWV ha portato ad un aumento della longevità e una riduzione del titolo virale. Inoltre, l'alimentazione diretta delle larve con tale dsRNA non sembra influenzare i tassi di sopravvivenza, suggerendo quindi che esso non è tossico per le larve (Desai *et al.*, 2012).

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO III: DWV E VARROA

L'azione combinata di parassiti e di patogeni è una delle principali cause di collasso delle colonie di api. Numerosi studi si sono concentrati su una specifica combinazione parassita/patogeno composta dall'ectoparassita *Varroa* e dal virus DWV, di cui la stessa *Varroa* funge da vettore. Mentre in passato gli effetti legati alla presenza di questi agenti, quali l'aumento dei tassi di mortalità e la riduzione della risposta immunitaria, erano principalmente attribuiti all'azione dell'acaro (Yang e Cox-Foster, 2005), con l'aumentare dei dati sperimentali tale ipotesi è stata ridimensionata a favore di una diversa tesi che pone invece in primo piano l'azione immunosoppressiva indotta dal DWV (Nazzi *et al.*, 2012; Kuster *et al.*, 2014; Ryabov *et al.*, 2014). Un interessante studio ha infatti dimostrato come il DWV assuma un ruolo principale nei processi di regolazione della risposta immunitaria delle api, attraverso la modulazione negativa del fattore di trascrizione *dorsal-1A*, che è membro della famiglia delle proteine NF- κ B (Nazzi *et al.*, 2012). Tale proteina svolge un ruolo chiave non solo nella modulazione della risposta immunitaria, inducendo tra l'altro l'attivazione delle difese antivirali, ma anche ad esempio nella riallocazione delle fonti energetiche tra sistema immunitario e metabolico in modo da ottimizzare le risorse investite per far fronte alle minacce (Nazzi e Pennacchio, 2014). La sola presenza della *Varroa* non induce invece la regolazione negativa dell'espressione di tale fattore di trascrizione (Nazzi *et al.*, 2012). In accordo con tali dati, recenti studi condotti su api con alti livelli di infezione virale hanno mostrato alterazioni a carico di geni coinvolti nel pathway Toll (Ryabov *et al.*, 2014). Nelle api provenienti da colonie affette da CCD, e quindi con elevati titoli virali, si osservano alterazioni a carico delle difese legati a pathway quali JAK-STAT o dipendenti da NF- κ B, mentre sembrano inalterate le difese legate a meccanismi dell'RNAi (Nazzi e Pennacchio, 2014). Non secondaria è però l'azione della *Varroa* che non solo funge da vettore del virus ma, attraverso l'attività trofica, induce un forte stress metabolico e l'attivazione di altre risposte immunitarie da ferita. Il conseguente abbassamento delle barriere antivirali consente un'intensa replicazione virale che determina un incremento della mortalità delle api, che può portare alla perdita della colonia (Nazzi e Pennacchio, 2014).

L'associazione *Varroa*/DWV ha, quindi, un profondo impatto negativo sulle popolazioni di api, forse decisamente quello più importante. Tuttavia, ad oggi, i dettagli dei meccanismi che regolano questa associazione sono non ancora del tutto chiari. Nel Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", presso il Dipartimento di Agraria dell'Università di Napoli "Federico II", in collaborazione con l'Università di Udine, sono stati studiati i meccanismi di immunosoppressione del DWV, valutando anche se e come quest'ultima fosse in grado di influenzare l'acaro e la sua fitness. I risultati di questo studio sono stati pubblicati su PNAS e l'articolo relativo viene qui di seguito riportato.

A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health

Gennaro Di Prisco^{a,1}, Desiderato Annoscia^{b,1}, Marina Margiotta^a, Rosalba Ferrara^a, Paola Varricchio^a, Virginia Zanni^b, Emilio Caprio^a, Francesco Nazzi^{b,2}, and Francesco Pennacchio^{a,2}

^aDipartimento di Agraria, Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay," Università degli Studi di Napoli "Federico II," 80055 Portici (NA), Italy; and ^bDipartimento di Scienze AgroAlimentari Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, 33100 Udine, Italy

Edited by David L. Denlinger, Ohio State University, Columbus, OH, and approved January 26, 2016 (received for review December 1, 2015)

Honey bee colony losses are triggered by interacting stress factors consistently associated with high loads of parasites and/or pathogens. A wealth of biotic and abiotic stressors are involved in the induction of this complex multifactorial syndrome, with the parasitic mite *Varroa destructor* and the associated deformed wing virus (DWV) apparently playing key roles. The mechanistic basis underpinning this association and the evolutionary implications remain largely obscure. Here we narrow this research gap by demonstrating that DWV, vectored by the *Varroa* mite, adversely affects humoral and cellular immune responses by interfering with NF- κ B signaling. This immunosuppressive effect of the viral pathogen enhances reproduction of the parasitic mite. Our experimental data uncover an unrecognized mutualistic symbiosis between *Varroa* and DWV, which perpetuates a loop of reciprocal stimulation with escalating negative effects on honey bee immunity and health. These results largely account for the remarkable importance of this mite-virus interaction in the induction of honey bee colony losses. The discovery of this mutualistic association and the elucidation of the underlying regulatory mechanisms sets the stage for a more insightful analysis of how synergistic stress factors contribute to colony collapse, and for the development of new strategies to alleviate this problem.

Apis mellifera | *Varroa destructor* | deformed wing virus | mutualistic symbiosis | honeybee colony losses

The mismatch between the increasing demand for pollination in agriculture and the capacity of honey bees to provide such ecological service severely undermines the sustainability of our food production system (1). Indeed, apiculture is facing a major crisis owing to concurrent factors, such as landscape deterioration, agrochemicals, and parasites (2). Honey bee colony losses have been a major problem since the beginning of modern apiculture (3); however, in 2006, the dramatic dimension of this phenomenon attracted public attention and increasing interest in the scientific community. Several years of intense investigation did not reveal a specific causal agent, but a multifactorial origin was proposed for this syndrome, which is often associated with high levels of parasites in combination with pathogens (2, 4). It was evident that the immunocompetence of honey bees in collapsing colonies was impaired, undermining their capacity to face the biotic stress factors occurring in the hive ecosystem. Indeed, a number of studies have identified important roles of the parasitic mite *Varroa destructor* (5) and vectored viral pathogens, particularly the deformed wing virus (DWV) (6), in contributing to significant changes in the global viral landscape and a continuing decline in honey bee health (7–9).

We recently contributed to this research issue, proposing a functional model describing how the delicate immune balance underpinning the covert infections of DWV can be destabilized by *Varroa* feeding, resulting in intense viral proliferation (10). That earlier study provided evidence supporting a major role of DWV in the immune suppression process, characterized by a

negative impact on a member of the NF- κ B protein family (10). Separate independent work further corroborated this evidence, showing that viral infection in honey bees interfered with the expression of genes that participate in the Toll pathway (11, 12). This finding supports the hypothesis that in honey bees, and more generally in insects, inducible antiviral barriers besides RNAi-mediated mechanisms (11–18) may have an important role. Indeed, in collapsing colonies, these latter barriers under NF- κ B or JAK-STAT control appear to be targeted, whereas the RNAi machinery seems to be unaffected (19).

The occurrence, often asymptomatic, of DWV in nearly all honey bee colonies (6), favored by the active vectoring activity of *Varroa* mite (5), represents a constant threat that can become a severe problem in the presence of additional stress factors, such as, among others, pesticides and poor nutrition, which can promote viral replication (8, 20). Therefore, multiple stress agents exert a synergistic action that compromises the delicate immune balance underpinning the covert DWV infections, and may well account for the multifactorial origin of colony losses.

Collectively, the available experimental evidence indicates that DWV adopts a virulence strategy, still obscure from a molecular standpoint, that targets antiviral barriers under control of the Toll pathway. This virulence strategy can have multifaceted functional implications as a consequence of the central role of NF- κ B in immunity and cross-modulated physiological pathways (8), as well as in control of the behavior-specific neurogenomic

Significance

The parasitic mite *Varroa destructor* and the deformed wing virus (DWV) are linked in a mutualistic symbiosis. The mite acts as vector of the viral pathogen, whereas the DWV-induced immunosuppression in honey bees favors mite feeding and reproduction. This functional interaction underpins a rapidly escalating immunosuppression, which can be primed and/or aggravated by a wealth of stress factors that co-trigger colony losses. Our experimental results explain the pivotal role proposed for the *Varroa*–DWV association in the induction of honey bee colony losses. Here we provide a functional framework for studying the dynamics of this multifactorial syndrome and defining effective strategies to reduce its negative impact on the beekeeping industry.

Author contributions: F.N. and F.P. designed research; G.D.P., D.A., M.M., R.F., P.V., V.Z., E.C., and F.N. performed research; G.D.P., D.A., and F.N. analyzed data; and F.N. and F.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹G.D.P. and D.A. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: francesco.nazzi@uniud.it or f.pennacchio@unina.it.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1523515113/-DCSupplemental.

states in the brain that rely on specific transcriptional modules controlled by this transcription factor (21).

The active role of *V. destructor* in the dispersal and enhanced replication of the virus, triggered by parasite feeding (7, 10, 12, 22), indicates that the mite-virus association has clear benefits for the latter, whereas an adaptive value for the mite, if any, remains unknown. The feeding behavior of *V. destructor* is complex, characterized by prolonged use of a feeding hole created by the mother mite on abdominal sternites of the bee pupa, through which both the mother and its offspring repeatedly feed on the bee's hemolymph (23). Any humoral and cellular immune reaction in the host, such as hemolymph clotting, melanization, or encapsulation, that directly interferes with food uptake and use may in principle result in reduced mite fitness. Therefore, based on current knowledge about DWV-induced immunosuppression, a positive influence of viral infection on mite feeding and reproduction can be hypothesized. However, notwithstanding the key importance of the *Varroa*-DWV association, the intimate aspects of their interaction have been largely overlooked.

Here we focus on the functional basis of this tight association, examining the impact of DWV infection on multiple immune barriers under the Toll pathway and assessing whether this has any effect on *Varroa* mite fitness. These are very relevant issues that, if properly addressed, can provide mechanistic insights of key importance to understand the dynamics of mite-virus association and developing new strategies to alleviate its dramatic impact on honey bee colonies.

Results

DWV Infection and Honey Bee Immunosuppression. To study the DWV-induced immunosuppression, we first assessed at the phenotypic level how the cellular and humoral components of the immune response vary across different DWV infection levels, irrespective of the presence of *Varroa*, in the absence of other viral pathogens. We did this by scoring the degree of encapsulation and melanization of a nylon thread at 24 h after its implantation into the body of a fifth instar honey bee larva, whose infection level, scored as the number of DWV genome copies, was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The melanization and encapsulation response in experimental larvae were negatively correlated with DWV titer (melanization: $\rho = -0.656$, $n = 28$, $P < 0.001$; encapsulation: $\rho = -0.390$, $n = 28$, $P = 0.040$) (Fig. 1). It is worth noting that any possible effect of mite parasitism at this stage can be virtually excluded, because mite feeding begins at the prepupal stage, within the sealed brood cell.

Melanization and encapsulation in insects are mediated by a number of genes that control the formation of a cellular capsule around foreign intruders and the deposition of melanin and other toxic molecules on their surface (24). Moreover, although the processes of clotting and of nodule and capsule formation differ in their final appearance, they share some molecular steps, and both involve melanin biosynthesis (24–26). Among the immune genes involved in these reactions is a sequence of key importance codes for a protein generating amyloid fibers that mediate encapsulation and strictly localized melanization of nonself material in Lepidoptera (27, 28). Here we cloned and characterized the cDNA of the homolog of this gene in *Apis mellifera* (GenBank accession no. KU513387), hereinafter denoted as *Amel102*. This full-length cDNA encodes a predicted protein of 270 aa that shows 36% sequence identity with P102Hv (27) (Fig. S1). The expression profile of *Amel102* in different tissues of honey bee larvae, assessed by qRT-PCR analysis, matched that observed in lepidopteran larvae, showing high levels of expression in the haemocytes and lower levels in the gut and fat body (Fig. 2A; adjusted $H = 11.52$, $df = 2$, $P = 0.003$).

To assess whether *Amel102* is an inducible immune gene under NF- κ B control, we silenced this transcription factor by RNAi and assessed the expression level of *Amel102* by qRT-PCR. The significant down-regulation of *dorsal-1A* in honey bees exposed to dsRNA targeting this gene (Fig. 2B; $H = 11.57$, $df = 1$, $P < 0.001$) was associated with a drastic drop in the transcription

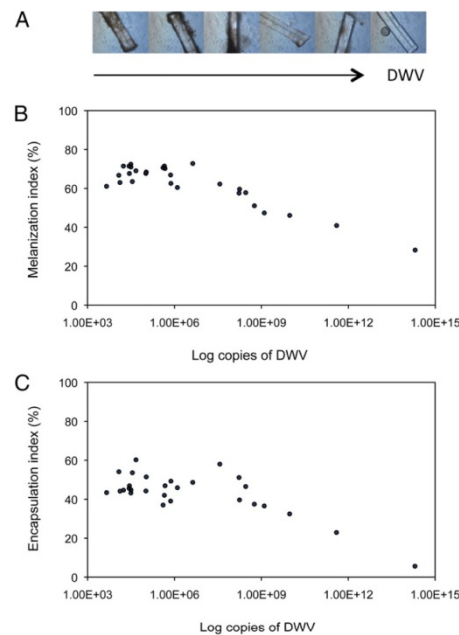


Fig. 1. Immunocompetence of honey bee larvae as affected by DWV infection. (A) Nylon threads at 24 h after implantation into the body of fifth instar honey bee larvae with increasing DWV infection levels. (B) Level of melanization of a nylon thread implant in honey bee larvae with different levels of viral infection, measured as number of DWV genome copies ($\rho = -0.656$, $n = 28$, $P < 0.001$). (C) Level of encapsulation of a nylon thread implant in honey bee larvae with different levels of viral infection, measured as number of DWV genome copies ($\rho = -0.390$, $n = 28$, $P = 0.040$).

level of *Amel102* (Fig. 2C; $H = 14.29$, $df = 1$, $P < 0.001$). This clearly indicates that *Amel102* is under NF- κ B control.

To demonstrate the possible occurrence of an upstream viral action on the Toll pathway with effects on various immune responses under NF- κ B control, we scored the impact of different levels of DWV infection on the transcription of *Amel102* and *apidaecin*, a gene encoding an antimicrobial peptide under NF- κ B control (29), as also supported by its strong down-regulation in response to *dorsal-1A* silencing performed in our experiment (Fig. S2; $H = 14.29$, $df = 1$, $P < 0.001$). We found that the transcription level of *Amel102* was negatively correlated with the level of DWV infection (Fig. 3A; $\rho = -0.575$, $n = 28$, $P = 0.001$). This result is consistent with the expected central role of the *Amel102* gene in melanization and encapsulation, as well as the negative effect of DWV on such processes. Moreover, a negative correlation was also found between the transcription level of *apidaecin* and the level of DWV infection (Fig. 3B; $\rho = -0.636$, $n = 28$, $P < 0.001$). Collectively, these results corroborate the importance of viral infection on honey bee immunosuppression, and clearly indicate that the adverse effect of DWV on the bees' immune response is caused by an upstream alteration of the Toll pathway.

Because NF- κ B activation in honey bees is negatively modulated by a leucine repeat protein (*AmelLRR*) (30), we

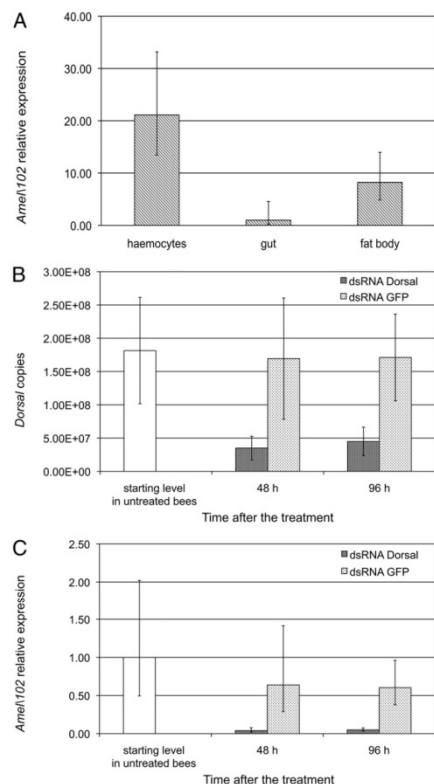


Fig. 2. *AmeH102* transcriptional profile and regulation. (A) *AmeH102* transcription profile in honey bee larval tissues (adjusted $H = 11.52$, $df = 2$, $P = 0.003$). (B) Transcription level of *dorsal-1A* in honey bees maintained for different time intervals on a sucrose/propelant solution containing a dsRNA targeting this gene (dsRNA *dorsal*) or dsRNA *GFP* as a control. (C) Transcription level of *AmeH102* as affected by silencing of *dorsal-1A*. The error bars indicate the SD of the mean. The significant drop in *dorsal-1A* transcription ($H = 11.57$, $df = 1$, $P < 0.001$) was associated with a significant transcriptional down-regulation of *AmeH102* ($H = 14.29$, $df = 1$, $P < 0.001$).

investigated whether the transcription rate of its encoding gene can be influenced by the level of viral infection. Indeed this was the case as demonstrated by a positive correlation between the number of DWV genome copies and the transcription rate of *AmelLRR* (Fig. 3C; $\rho = 0.511$, $n = 28$, $P = 0.005$). This result indicates that DWV infection could have a negative effect on NF- κ B activation by enhancing the transcription of its negative modulator *AmelLRR*. The possibility that DWV adopts a virulence strategy somewhat similar to that recently described for *Salmonella*, which targets an NLR protein that negatively regulates NF- κ B signaling (31), is an intriguing hypothesis meriting further research efforts.

To assess whether the observed immunosuppression was due exclusively to the action of DWV infection, we performed an

additional experiment in vitro. Honey bee larvae were exposed to a controlled *Varroa* infestation, and the expression level of *Amel102*, as affected by mite feeding, was assessed in the presence or absence of DWV infection. The lowest transcription rates of *Amel102*, which appears to be under NF- κ B control, were observed in DWV-infected larvae, irrespective of the presence or absence of *Varroa* (comparison of DWV infection levels: $F = 66.37$, $df = 1$, $P < 0.001$; comparison of mite infestation levels: $F = 2.74$, $df = 1$, $P = \text{not significant}$; interaction: $F = 1.69$, $df = 1$, $P = \text{not significant}$) (Fig. 3D). Therefore, this gene appears to be a good molecular marker of honey bee immunocompetence as affected by DWV infection. The matching pattern of variation shown by *Amel102* transcription and the immune parameters scored above (Fig. 1) indicates that this gene, as in lepidopterans, plays an important role in the modulation of both humoral and cellular immune responses and is targeted by DWV, which adversely affects NF- κ B signaling through a molecular mechanism that remains to be studied.

Effect of Honey Bee Immunosuppression on Varroa Fitness. To assess whether the immunosuppressive action of DWV can facilitate mite feeding and, consequently, increase mite fitness, we assessed mite reproduction in honey bees showing variable levels of DWV infection. To do so, we artificially infested fifth instar honey bee larvae with one mite each and kept them under laboratory conditions for 12 d (Fig. S3). After pupation, we noted the possible presence of offspring generated by each mother mite during the honey bee's metamorphosis, and assessed the viral infection level of the honey bee, as the number of DWV genome copies, by qRT-PCR. We replicated this experimental setup twice, resulting in 90 bee samples. The proportion of reproducing mites (i.e., fertility) increased with DWV infection level up to a threshold of 10^6 genome copies per honey bee, after which very high viral loads seemed to exert a negative impact on mite reproduction (Fig. 4a; equation of the curve describing the observed trend: $y = -0.0123x^{2.4} + 0.1979x - 0.2437$, $R^2 = 0.868$, $df = 3$, $P = 0.048$). Overall, mite fertility was similar to that reported previously under the same experimental conditions (32), and clearly varied according to the level of DWV infection.

The occurrence of crippled wings at eclosion is a characteristic symptom of an overt virus infection in honey bees, induced by a high DWV load (6). In fact, we found a significant correlation between viral load and wing deformity in 46 samples from the previous experiment, in which the condition of wings was evident at the time of sampling ($\chi^2 = 5.894$, $df = 1$, $P = 0.015$). Therefore, to check the observed positive relationship between viral infection and mite reproduction, we performed an additional *in vitro* experiment in which we assessed the reproduction of mites feeding on immature honey bees with either deformed or normal wings at the adult stage (Fig. S4). We studied a total of 149 honey bees, 49 of which had deformed wings at eclosion. The fertility rate approached 40% in mites infesting larvae giving rise to deformed wing bees, but was limited to only 22% when the host larvae developed into normal wing bees (Fig. 4B; $\chi^2 = 4.64$, $df = 1$, $P = 0.031$). Conversely, the number of offspring generated by each reproducing mite (i.e., fecundity) did not seem to be affected (Fig. S5).

Collectively, our data demonstrate that mite fertility is enhanced by high DWV titers, and support the hypothesis that viral infection promotes *Varroa* fitness.

Discussion

The results of this study show that honey bees with increasing DWV loads have reduced immunocompetence at both the humoral and cellular levels. The negative impact of the combined action of *Varroa* and DWV on honey bee immunity has been proposed based on the results of several studies showing variable levels of transcriptional down-regulation of immune genes in most cases. The very close relationship between the mite and the virus, along with the complexity of the results from transcriptomic studies, have generated a somewhat contrasting picture, however. The initially proposed primary role for the parasitic mite in

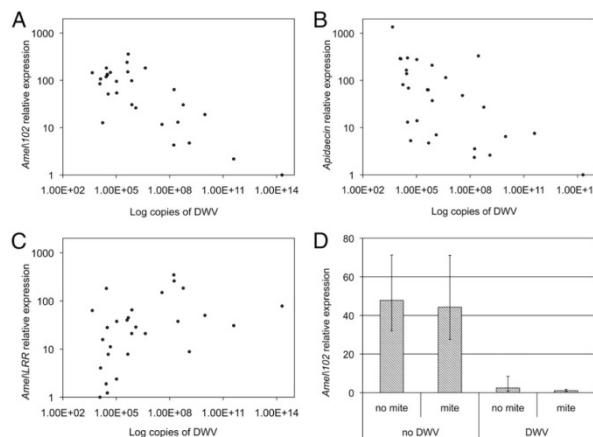


Fig. 3. Gene expression in honey bee larvae as affected by DWV infection. (A–C) Effect of DWV infection level on transcription of (A) *AmeN102* ($\rho = -0.575$, $n = 28$, $P = 0.001$), (B) *apidaecin* ($\rho = -0.636$, $n = 28$, $P < 0.001$), and (C) *AmeNLR* ($\rho = 0.511$, $n = 28$, $P = 0.005$). (D) *AmeN102* transcription as affected by DWV infection ($F = 66.37$, $df = 1$, $P < 0.001$) and feeding activity by the *Varroa* mite ($F = 2.74$, $df = 1$, $P = \text{not significant}$; interaction: $F = 1.69$, $df = 1$, $P = \text{not significant}$). Error bars indicate SD.

the induction of this immune syndrome (33) has been challenged by several studies that apparently do not support this hypothesis (12, 22, 34–36), even though the possibility that *Varroa* feeding and its saliva may modulate immune effector molecules cannot be ruled out, as suggested by the effect of this secretion on insect hemocytes in vitro (37). Moreover, a direct immunosuppressive activity of DWV targeting the antiviral barriers under NF- κ B control has been proposed in the framework of a bistable dynamic model that assumes a transition from immunostimulation to immunosuppression as the DWV titer increases and then exceeds a critical threshold (Ct) (10). This working hypothesis is in tune with more recent data indicating that in honey bees from colonies affected by colony collapse disorder, which regularly show high levels of viral infection, the immune response mediated by the RNAi machinery is apparently unaffected (19). Furthermore, immune genes in the Toll pathway are down-regulated in honey bees exposed to *Varroa* and bearing high DWV loads (12) or challenged with nonspecific dsRNAs (11).

Our present data, obtained with a more focused functional approach, demonstrate the immunosuppressive role of DWV and show that its virulence strategy for overcoming the specific antiviral barriers under the Toll pathway by disrupting NF- κ B signaling inevitably has a multifaceted influence on different arms of the immune response. This has a direct impact on the fitness of the *Varroa* mite, possibly facilitating the mite's ectoparasitic trophic activity. Thus, the viral pathogen has a positive influence on mite feeding and consequently on its reproduction, as measured in this study. Given the strong impact of mite feeding on viral replication (10, 12), a loop of reciprocal stimulation of the two symbionts is evident, which largely accounts for their central role in honey bee colony losses (7, 10).

The basal level of infertility in *Varroa* mite populations can be quite high and may vary for reasons not completely understood, often related to undefined host factors (5). We suggest that the presence and level of infection by DWV may partly account for this variation, which could be due to different levels of host immunosuppression. Even though this positive effect of DWV infection on mite reproduction can be partly induced by enhanced feeding efficiency, we cannot rule out the possibility of a greater nutritional suitability of infected hosts, which is an issue meriting

further research efforts aimed at fully characterizing the host regulation strategy adopted by the *Varroa* mite.

The concept of host regulation is adopted to describe a wide range of host physiological and behavioral changes induced by parasites of arthropods, which have been especially well investigated in insect parasitoids (38). These carnivorous insects, particularly parasitic wasps of the order Hymenoptera, are able to colonize and exploit living insect hosts using a wealth of virulence factors (38). The ovarian secretions injected by adult females during oviposition may contain symbiont viruses (39), which in some parasitic wasps of caterpillars are members of the unique family Polydnviridae (39–41). The ancestor of these viral symbionts in the genus *Bracovirus* was a viral pathogen of the host, in the Nudivirus group, now stably integrated into the wasp genome and used as a tool to deliver virulence factors (41, 42). The *Varroa*–DWV association could be considered a similar symbiotic relationship, but at an early stage and with a less intimate level of integration, where the vector role of *Varroa* is paid back by a DWV-induced fitness enhancement mediated by host immunosuppression. This seems to be part of a unique evolutionary pattern promoting the “alliance” of parasitic arthropods with viral pathogens of the host to overcome its immune barriers (39).

The results of our present study shed new light on the *Varroa*–DWV association, supporting a previously unrecognized mutualistic symbiosis. This information accounts for the central importance of the mite–virus complex in the induction of honey bee colony losses, and sets the stage for studies aiming to develop new management strategies for one of the most dangerous parasite–pathogen associations for the beekeeping industry. Indeed, any environmental stress that interferes with honey bee immunocompetence and promotes DWV replication in individuals bearing covert infections (8, 10, 30) also has an indirect effect on *Varroa*, which is favored by the escalating viral-induced immunosuppression. This may account in part for the recently observed positive correlation between *Varroa* populations and honey bee exposure to neonicotinoids (43, 44), which are known to promote viral replication in DWV-infected honey bees (30); however, additional field evidence is needed to support this hypothesis. A more thorough understanding of the molecular mechanisms underlying this self-boosted process that enhances the

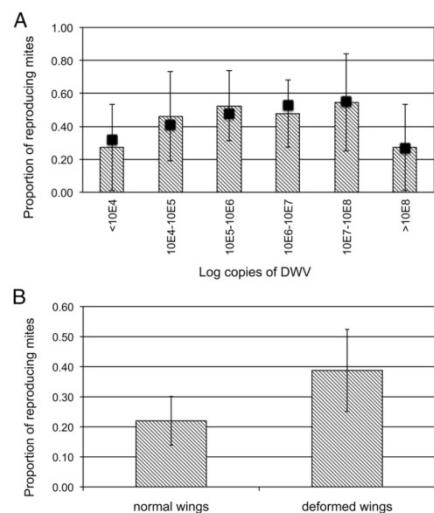


Fig. 4. Viral infection and mite reproduction. (A) Proportion of reproducing *Varroa* mites (i.e., fertility) on honey bees with different levels of DWV infection. The equation of the curve describing the observed trend and the correlation coefficient are $y = -0.0122x^2 + 0.1979x - 0.2437$ and $R^2 = 0.868$ ($df = 3$, $P = 0.048$). The black squares represent the values expected under this model. (B) Mite fertility on honey bees with deformed or normal wings at eclosion ($\chi^2 = 4.64$, $df = 1$, $P = 0.031$). Error bars indicate the 95% confidence limits of the proportions.

fitness of both symbionts, as well as its modulation by interacting stress factors, will be crucial to understand the complex dynamics of honey bee colony losses and developing novel strategies to alleviate its significant negative impact on agriculture and environment.

Materials and Methods

Biological Material. The honey bees and mites used in this study were from *A. mellifera ligustica* colonies maintained in the experimental apiary of the Università degli Studi di Napoli "Federico II" and from *A. mellifera ligustica* × *A. mellifera carnica* colonies maintained in the experimental apiary of the Università degli Studi di Udine.

In brief, to obtain both the fifth instar honey bee larvae and the mites needed for artificial infestation and in vitro rearing experiments, all of the sealed cells of several brood combs were marked on the evening before the experiment. The next morning, the brood combs were transferred to the laboratory, and all of the unmarked cells that had been sealed during the preceding 12–15 h were unsealed with forceps. The frames were incubated at 35 °C and 75% relative humidity, to allow the honey bee larvae to emerge from cells together with possible infesting mites. When needed, honey bee larvae were isolated in gelatin capsules (6.5 mm diameter) together with one mite each, and then kept in an incubator at 34–35 °C and 75–80% relative humidity.

Encapsulation and Melanization Assay. Fifth instar honey bee larvae ($n = 40$) were obtained from freshly capped cells. A piece of nylon thread (0.08 mm) was inserted into the hemocelic cavity under a stereomicroscope at 20× magnification. After 24 h, the implants were removed and photographed under a light microscope (400×). Image analysis was performed using GIMP version 2.8 (GNU Image Manipulation Program; www.gimp.org). The degree of encapsulation was scored as the percentage of nonwhite pixels (i.e., covered by hemocytes). The melanization index (a percentage) was calculated as $(1 - x/255)/100$, where x represents the mean degree of gray

intensity (a numerical reading ranging from 0 for black to 255 for white) of the pixels in the area covered by hemocytes. The rest of the body was immediately stored at –80 °C for the subsequent molecular analysis. All samples were analyzed by qRT-PCR to assess for the possible presence of black queen cell virus and sacbrood virus, which were previously found in the same area, although at a comparatively much lower prevalence than DWV (10). A total of 28 larvae were considered for the analysis, after discarding nine larvae showing prolonged bleeding after the implantation and three larvae showing the presence of viral pathogens other than DWV.

Cloning of the *AmeN102* Gene. To clone the *A. mellifera* homolog of the 102Hv gene, we first blasted the protein sequence of 102Hv (GenBank accession no. CBY85302.1) against the "nonredundant protein sequences" (nr) database of the honey bee genome. A sequence (XP_003251941.1) showing 36% identity with 102Hv was identified, and the corresponding cDNA was obtained by qRT-PCR and elongated by 5' and 3' RACE, using specific primer pairs (Table S1). This cDNA is contained in a contig (11266) of the whole genome shotgun sequence (GenBank accession no. AADG06011266.1).

Expression Analysis of the *AmeN102* Gene. We measured the expression profile of *AmeN102* in various tissues of honey bee larvae by qRT-PCR. For this, we used a micropipette to collect the hemolymph exuding from a puncture made with a sterile needle in the dorsal vessel in the fourth abdominal segment of fifth instar honey bee larvae ($n = 15$), which was transferred in 40 μ L of PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 10 mM phosphate buffer, pH 7.4). After bleeding, experimental larvae were dissected under an optical stereomicroscope (20×) to separate the gut and the fat body. Hemolymph samples were centrifuged at 600 × g for 6 min, to isolate the hemocytes. All tissues to be analyzed were immediately transferred in a cold extraction buffer for subsequent total RNA extraction.

To assess whether *AmeN102*, *apidaecin*, and *AmeNLR* expression is influenced by DWV infection, we performed qRT-PCR to determine transcription levels in honey bee larvae with different levels of viral genome copies in the samples used for the encapsulation and melanization experiments. To examine whether immunosuppression was due exclusively to the action of DWV infection, we performed an additional experiment in which honey bee larvae were exposed to a controlled *Varroa* infestation. At the end of the experiment, we measured the expression level of *AmeN102*, as affected by mite feeding, in the presence and absence of DWV infection. To do so, we collected fifth instar honey bee larvae from freshly capped cells and introduced them singly into gelatin capsules (6.5 mm diameter), along with a single *Varroa* mite obtained from a highly infested colony. An equal number of uninfested fifth instar honey bee larvae served as controls. Rearing capsules were then transferred into an incubator and kept at 35 °C and 80% relative humidity. After 24 h, honey bee larvae were flash-frozen at –80 °C for the molecular analysis. Ten individuals for each experimental combination of *Varroa* infestation and DWV infection were selected at random, and the transcription level of *AmeN102* was measured.

Virus Infection and Mite Reproduction. We artificially infested fifth instar honey bee larvae with one mite each and kept them in gelatin capsules at 35 °C and 75% relative humidity (32). After 12 d, at the end of the pupal stage, cells were opened and inspected under a stereomicroscope to assess the possible occurrence of honey bee wing deformity and mite reproduction. The honey bees were then stored at –80 °C for subsequent qRT-PCR to assess the viral genome copy number.

This experiment was replicated twice. A total of 90 honey bees in which the viral infection level as well as mite reproduction could be assessed were obtained and used in the analysis. Five honey bees that appeared to be uninfested were not used in this analysis.

Because the relationship between wing deformity at the adult stage and viral load is well known from the literature (6) and confirmed by the present study, we conducted another experiment in which artificially infested honey bee larvae were checked after reaching the adult stage (when wing deformity can be unequivocally assessed). The status of their wings correlated with the reproduction of the mites feeding on them. We replicated the experiment six times, obtaining 149 adult honey bees, of which 100 had normal wings and 49 had crippled wings.

qRT-PCR. qRT-PCR was performed following standard methods, as described in detail in *SI Materials and Methods*.

RNAi. Double-stranded honey bee *dorsal-1A* (*A. mellifera* Dorsal variant A, mRNA, GI:58585243, 2389 bp) was prepared using the MEGAscript RNAi Kit (Ambion), following the manufacturer's standard protocol. The target sequence

was PCR-amplified with specific primers, carrying a 5' tail of the T7 promoter at both ends and used as template for T7-dependent in vitro transcription. The following primers were used: forward, 5'-TAATACGACTACTATAGGAGACA-ATCCAGCACTTATTC-3'; reverse, 5'-TAATACGACTACTATAGGAGCCTG-AATAGTGTATTAGC-3'. The reaction product was subjected to DNase digestion and purified, and the final preparation was dissolved in nuclease-free water.

Individual frames were removed from the colony and stored in an incubator overnight at 34 °C and 90% relative humidity. Emerging bees were maintained as groups of 30 individuals in sterile boxes and fed daily with 2 mL of a 50% sucrose/protein solution, containing 50 µg of dsRNA of *dorsal-1A*. Controls were fed with a similar solution containing a dsRNA of mGFP6, obtained as described above. Samples were collected from five bees at the beginning of the experiment, to assess the starting level of scored parameters, and again after 48 h and 96 h of exposure to the dsRNA feeding solution. Samples were stored at -80 °C until use for RNA extraction.

The transcription levels of *dorsal-1A* and *apidaecin* and the number of DWV genome copies were determined by SYBR Green qRT-PCR, as described above.

Bioinformatic and Statistical Analyses. Alignment of *Heliothis virescens*, *Spodoptera littoralis*, *Drosophila melanogaster*, and *A. mellifera* protein sequences was performed using the ClustalW algorithm. Secondary structure prediction of *A. mellifera* P102 was carried out with InterProScan tool and the EMBOS: garnier algorithm. Analyses were performed using Geneious version 6.1.6 (Bio-matters; available from www.geneious.com).

All of the correlation analyses were carried out using the Spearman rank-sum method. The expression profile of *AmeN102* in different honey bee tissues was analyzed using Kruskal-Wallis one-way ANOVA.

In the RNAi experiments, gene expression and viral replication in bees fed with dsRNA of *dorsal-1A*, or dsRNA of GFP as controls, were compared using the Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test. Five bees per each treatment were used in the analysis. *AmeN102* transcription as affected by DWV infection and feeding activity by *Varroa* was analyzed using the Scheirer-Ray-Hare extension of the Kruskal-Wallis test.

The polynomial curve fitting the distribution of *Varroa* mite fertility rates associated with different levels of honey bee viral infection, expressed as the logarithm of the average infection level of the bees in each class, was calculated using the least squares method. The relationship between viral load and wing deformity was assessed by logistic regression. The fertility of *Varroa* mites on honey bees with normal and crippled wings was analyzed using the χ^2 test. The 95% confidence limits of the fertility reported in Fig. 4 were calculated using the following equation: $1.96 \cdot \sqrt{P \cdot (1 - P)/n}$.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Spencer Behmer (Texas A&M University), Michael Strand (University of Georgia), and Silvia Gigliotti (Institute of Biosciences and Bioresources - Consiglio Nazionale delle Ricerche, IBBR-CNR) for their critical read of the manuscript, and Ilaria Di Lello and Adriana Marinelli (University of Napoli "Federico II") for their help and suggestions during the development of this study. The research leading to these results was funded by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013), under Grant 613960 (SMARTBEES).

- Breeze TD, et al. (2014) Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS One* 9(1):e82996.
- Ratnieks FLW, Carreck NL (2010) Ecology: Clarity on honey bee collapse? *Science* 327(5962):152-153.
- Underwood R, vanEngelsdorp D (2007) Colony collapse disorder: Have we seen this before? *Bee Cult* 35:13-18.
- Carreck N, Neumann P (2010) Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49(1):1-6.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1):S96-S119.
- de Miranda JR, Genersch E (2010) Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1):S48-S61.
- Martin SJ, et al. (2012) Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336(6086):1304-1306.
- Nazzi F, Pennacchio F (2014) Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends Parasitol* 30(12):556-561.
- Kielmanowicz MG, et al. (2015) Prospective large-scale field study generates predictive model identifying major contributors to colony losses. *PLoS Pathog* 11(4):e1004816.
- Nazzi F, et al. (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog* 8(6):e1002735.
- Flenniken ML, Andino R (2013) Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee. *PLoS One* 8(10):e77263.
- Ryabov EV, et al. (2014) A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathog* 10(6):e1004230.
- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML (2015) Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci* 10:71-82.
- Zamboni RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP (2005) The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(20):7257-7262.
- Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G (2009) An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(42):17841-17846.
- Sabin LR, Hanna SL, Cherry S (2010) Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Curr Opin Immunol* 22(1):4-9.
- Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW (2013) Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *J Mol Biol* 425(24):4921-4936.
- Lamiable O, Imler JL (2014) Induced antiviral innate immunity in *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* 20:62-68.
- Chejanovsky N, et al. (2014) Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* 454-455:176-183.
- Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347(6229):1255957.
- Chandrasekaran S, et al. (2011) Behavior-specific changes in transcriptional modules lead to distinct and predictable neurogenomic states. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(44):18020-18025.
- Kuster RD, Boncristiani HF, Rueppell O (2014) Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *J Exp Biol* 217(Pt 10):1710-1718.
- Donzé G, Guerin PM (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav Ecol Sociobiol* 34(5):305-319.
- Lemaître B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25:697-743.
- Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS (2004) Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends Immunol* 25(6):289-294.
- Dushay MS (2009) Insect hemolymph clotting. *Cell Mol Life Sci* 66(16):2643-2650.
- Falabella P, et al. (2012) Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochem Mol Biol* 42(3):203-211.
- Di Lello I, et al. (2014) Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi. *J Insect Physiol* 64:90-97.
- Evans JD, et al. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15(5):645-656.
- Di Prisco G, et al. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(46):18466-18471.
- Zaki MH, Man SM, Vogel P, Lamkanfi M, Kannekanti TD (2014) Salmonella exploits NLRP12-dependent innate immune signaling to suppress host defenses during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(1):385-390.
- Nazzi F, Milani N (1994) A technique for reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. under laboratory conditions. *Apidologie* 25:579-584.
- Yang X, Cox-Foster DL (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(21):7470-7475.
- Gregory PG, Evans JD, Rinderer T, de Guzman L (2005) Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *J Insect Sci* 5:7.
- Navajas M, et al. (2008) Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genomics* 9:301.
- Zhang Y, Liu X, Zhang W, Han R (2010) Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. *J Insect Physiol* 56(9):1207-1218.
- Richards EH, Jones B, Bowman A (2011) Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: Effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology* 138(5):602-608.
- Pennacchio F, Strand MR (2006) Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 51:233-258.
- White JA, Giorgini M, Strand MR, Pennacchio F (2014) Arthropod endosymbiosis and evolution. *Arthropod Biology and Evolution*, eds Minelli A, Boxshall G, Fusco G (Springer-Verlag, Berlin, Germany), pp 441-477.
- Strand MR, Burke GR (2013) Polydnavirus-wasp associations: Evolution, genome organization, and function. *Curr Opin Virol* 3(5):587-594.
- Herniou EA, et al. (2013) When parasitic wasps hijacked viruses: Genomic and functional evolution of polydnaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1626):20130051.
- Bézier A, et al. (2009) Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science* 323(5916):926-930.
- Alburaki M, et al. (2015) Neonicotinoid-coated *Zea mays* seeds indirectly affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials. *PLoS One* 10(5):e0125790.
- Dively GP, Embrey MS, Kamel A, Hawthorne DJ, Pettis JS (2015) Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLoS One* 10(3):e0118748.

Supporting Information

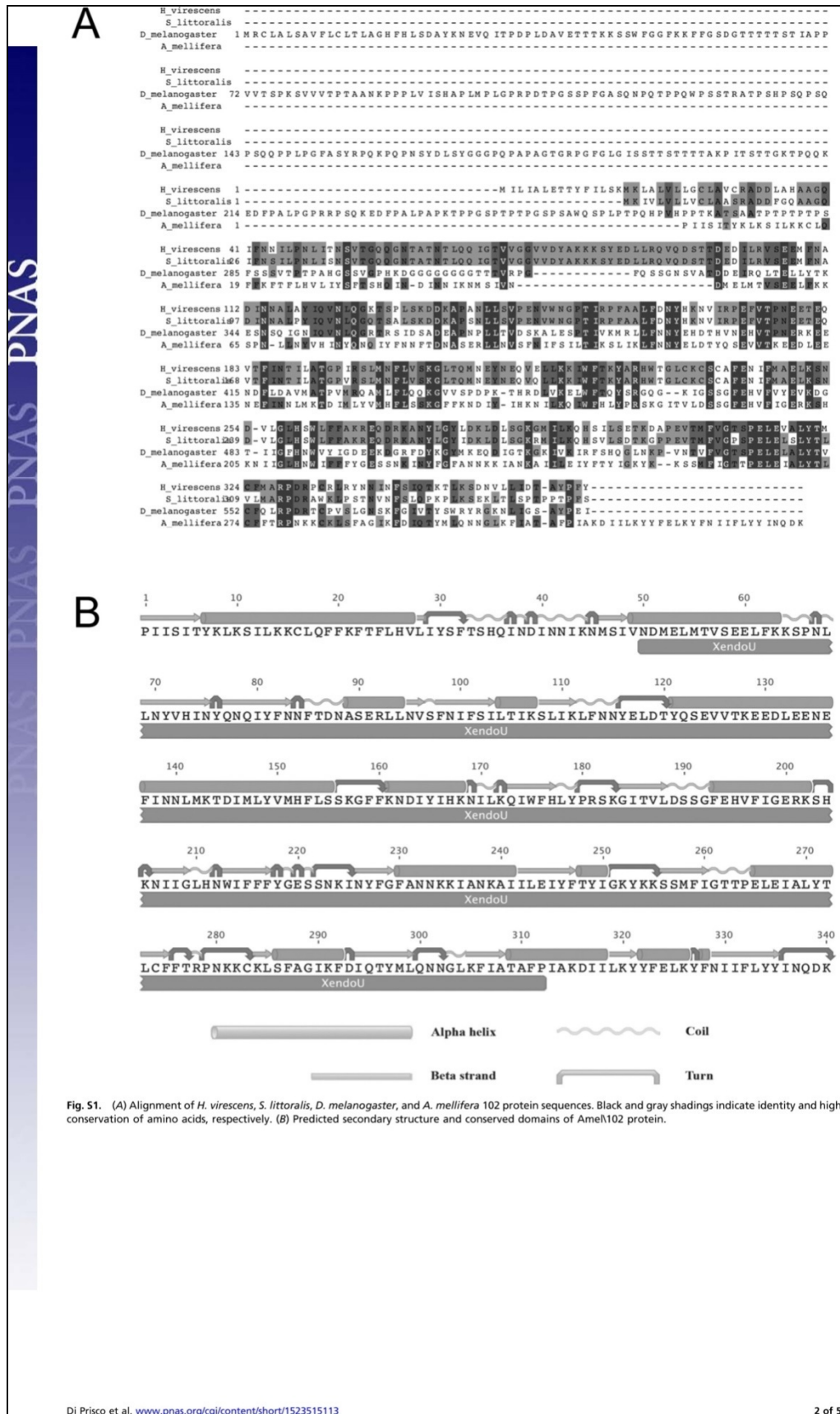
Di Prisco et al. 10.1073/pnas.1523515113

SI Materials and Methods

Total RNA for qRT-PCR was isolated from individual honey bees using TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of total RNA were determined by spectrophotometry (Nanodrop ND100; Thermo Fisher Scientific). Differential relative expression of *Amel102* was tested by means of SYBR Green qRT-PCR, using the primer pairs reported in Table S1. Relative gene expression data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. To verify that the amplification efficiencies of the target and reference genes (*β -actin*) were approximately equal, the amplification of five 10-fold dilutions of the total RNA sample (from 1,000 to 0.1 ng per reaction) in triplicate were analyzed. The efficiency plot for log input total RNA vs. ΔC_t had a slope lower than ± 0.1 (slope = -0.066 , $R^2 = 0.0961$).

The quantification of DWV genome copies in individual honey bees was performed by SYBR Green qRT-PCR. Titers of DWV were determined by relating the C_t values of unknown samples to an established standard curve. The standard curve was established by plotting the logarithm of seven 10-fold dilutions of a starting solution containing 21.9 ng of plasmid DNA pCR II-TOPO (TOPO-TA cloning) with a DWV insert (from 21.9 ng to 21.9 fg), against the corresponding C_t value as the average of three rep-

etitions. The PCR efficiency ($E = 107.5\%$) was calculated based on the slope and coefficient of correlation (R^2) of the standard curve, according to the following formula: $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$ (slope = -3.155 , y-intercept = 41.84 , $R^2 = 0.999$). Similarly, for quantification of *dorsal-1A* transcript numbers, the standard curve was established by plotting the logarithm of nine 10-fold dilutions of a starting solution containing 127.4 ng of plasmid DNA (TOPO-TA cloning) with a *dorsal-1A* insert (from 127.4 ng to 1.3 fg) against the corresponding C_t value as the average of three repetitions. The PCR efficiency ($E = 93.2\%$) was calculated as described above for DWV (slope = 23.495 , y-intercept = 46.19 , $R^2 = 0.996$). Amplifications were performed using the StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies) with the following thermal cycling profiles: one cycle at 48°C for 15 min for reverse transcription, one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, and one cycle at 68°C for 7 min, using the Power SYBR Green RNA-to- C_t 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific). All primer pairs were designed using PrimerExpress 3.0 software (Life Technologies) following the standard procedure. Negative (H_2O) and positive controls (previously identified positive samples) were included in each qRT-PCR run.



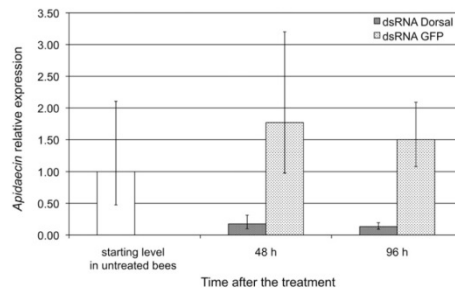


Fig. S2. Transcription level of *apidaecin* as affected by silencing of *dorsal-1A*. Error bars indicate the SD of the mean ($H = 14.29$, $df = 1$, $P < 0.001$).



Fig. S3. *V. destructor* adult on a honey bee larva kept in the gelatin capsule used for in vitro experiments on mite reproduction.



Fig. S4. A honey bee with deformed wings obtained from a larva artificially infested with a *Varroa* mite, which reproduced within the rearing cell. The mother mite and an immature offspring are seen on the abdomen.

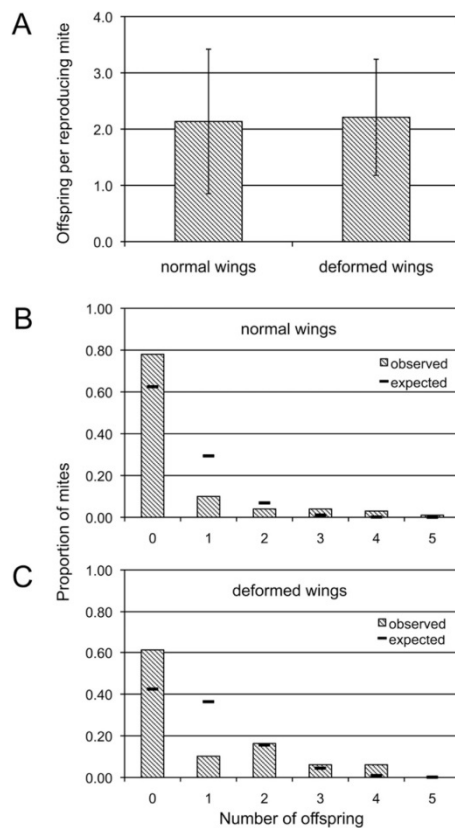


Fig. S5. Fecundity of mites infesting honey bees showing normal and deformed wings at eclosion (**A**) and the distribution of mites according to the number of offspring (**B** and **C**). (**B**) Mites kept on bees with normal wings on eclosion. (**C**) Mites on bees with deformed wings. Error bars indicate the SD. The hyphens in **B** and **C** indicate the proportion expected according to the Poisson distribution. The significant deviation observed in both normal-winged bees and deformed-winged bees ($\chi^2 = 18.02$, $df = 1$, $P < 0.001$ and $\chi^2 = 30.32$, $df = 2$, $P < 0.001$, respectively) suggests that the first and subsequent ovipositions are not independent events, and that reproduction needs to be triggered once for continuing as long as conditions are suitable.

Table S1. Primer pairs used in this study

Analysis	Name	Sequence, bp	Fragment, bp
RACE 5'	<i>AmeI\102</i> GSP	ATGGTTTCATTATATCCTCGA (22)	473
	<i>AmeI\102</i> NESTED GSP	GATATAATGTTATATGTCATGC (22)	
RACE 3'	<i>AmeI\102</i> GSP	CCTCGAAGTAAAGGAATAACTG (22)	444
	<i>AmeI\102</i> NESTED GSP	GAACATGTATTATAGGAGAAAG (23)	
qRT-PCR	DWV, forward	GCGCTTAGTGGAGGAAATGAA (21)	69
	DWV, reverse	GCACCTACGCGATGTAATCTG (22)	
qRT-PCR	<i>AmeI\102</i> , forward	CAACTCCAGAATTGGAAATAGCA (23)	160
	<i>AmeI\102</i> , reverse	TTTGCAATAGGAAAAGCAGTTG (22)	
qRT-PCR	<i>Actin</i> , forward	GATTTGTATGCCAACACTGTCCTT (24)	69
	<i>Actin</i> , reverse	TTGCATTCTATCTGCGATTCCA (22)	
qRT-PCR	<i>Dorsal</i> , forward	TCGGATGGTGCTACGAGCGA	153
	<i>Dorsal</i> , reverse	AGCATGCTTCTCAGTCTTCGCT	
qRT-PCR	<i>Apidaecin</i> , forward	TTTTGCCTTAGCAATTCCTGTTG	81
	<i>Apidaecin</i> , reverse	GAAGGTCGAGTAGGCGGATCT	
qRT-PCR	<i>AmeLRR</i> , forward	CTTGGTGAAGGCCTTGATG	87
	<i>AmeLRR</i> , reverse	ATGCAAAGAGCTATCATCA	

CAPITOLO IV: NUTRIZIONE

4.1 INTRODUZIONE

Il mantenimento e l'attivazione della risposta immunitaria rappresentano alcune delle attività fisiologiche più costose negli organismi che spesso, per far fronte ai fattori di stress, convogliano le energie nelle difese a discapito di altri aspetti che condizionano la fitness dell'organismo. Una carenza nello stato nutrizionale può compromettere il normale sviluppo dei meccanismi di difesa ed aumentare così la sua suscettibilità alle malattie. Negli esseri umani, ad esempio, la carenza di proteine nella dieta riduce le concentrazioni della maggior parte degli amminoacidi plasmatici e compromette il sistema immunitario (Li *et al.*, 2007). Pertanto, la disponibilità di proteine influenza l'immunocompetenza dell'individuo e quindi la sua capacità di combattere e resistere alle infezioni. Tuttavia sono pochi gli studi che valutano gli effetti che differenti diete, con diverse concentrazioni di proteine, possano avere sulle salute degli insetti e in particolare delle api.

L'ape rappresenta un prezioso modello di studio per determinare, ad esempio, come l'abbondanza e la diversità delle risorse ambientali possono influenzare lo sviluppo del sistema immunitario di un organismo. Queste, di solito, impollinano una grande varietà di piante ma in particolari condizioni, spesso causate dalle moderne pratiche agricole, sono costrette ad alimentarsi su singole colture (monocolture). L'unica fonte di proteine alimentari per le api è rappresentata dal polline, che contiene gli amminoacidi essenziali per il loro sviluppo e che è in grado di influenzare la longevità, lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee e delle ovaie (Pernal e Currie, 2000) e la suscettibilità ai patogeni (Rinderer e Elliott, 1977). In letteratura non sono invece disponibili studi che attestino in che misura l'apporto di amminoacidi possa influenzare l'immunocompetenza. La moria delle api a cui abbiamo assistito in questi ultimi anni ha posto l'accento anche sul possibile impatto che una cattiva nutrizione possa avere su questo fenomeno (van Engelsdorp *et al.*, 2009). Con l'obiettivo di colmare questo vuoto, in questa parte del lavoro abbiamo studiato come la nutrizione, in particolare il diverso apporto di amminoacidi, possa influenzare la sopravvivenza e l'immunocompetenza delle

api, anche in presenza di altri agenti di stress quali i neonicotinoidi, di cui è nota la loro azione immunosoppressiva (Di Prisco *et al.*, 2013).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Materiale biologico

Gli studi sono stati eseguiti su *A. mellifera L.*, raccolte da alveari tenuti in allevamento presso l'apiario sperimentale del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Grazie a un costante monitoraggio si conosce la storia pato-parassitologica di tutti gli alveari allevati; in particolare tali indagini trimestrali valutano la possibile presenza nelle colonie dei principali parassiti, quali la *Varroa*, e dei più comuni patogeni riscontrati nelle api, ossia l'ABPV, l'BQCV, l'CBPV, l'DWV, l'IAPV, l'KBV, l'SBV, l'ABPV, la *Nosema apis* e la *Nosema ceranae*.

La valutazione di alcuni aspetti caratteristici, quali l'esistenza di una popolazione adulta e di una covata giovane e opercolata, così come la presenza di abbondanti scorte glucidiche e proteiche, ci hanno permesso di stimare la forza delle varie colonie. I prelievi sono stati eseguiti nel corso della stagione apistica, quando è massima l'attività di foraggiamento delle api operaie, da alveari in buono stato di salute, ossia quelli che disponevano di almeno sette favi coperti da api adulte, di covata e di scorte alimentari di polline e miele abbondanti.

5.2.2 Preparazione della dieta

Nel corso degli esperimenti abbiamo testato simultaneamente l'effetto di diete contenenti una costante concentrazione di carboidrati (saccarosio) ma una diversa concentrazione di amminoacidi sulla salute delle api. La dieta è stata limitata ai carboidrati e agli amminoacidi perché questi sono i fondamentali componenti del miele e del polline (Hermosin *et al.*, 2003).

Ciascuno dei 10 amminoacidi essenziali (AE) per la dieta delle api, ossia metionina, triptofano, arginina, lisina, istidina, fenilalanina, isoleucina, treonina,

leucina e valina (de Groot, 1953) è stato aggiunto a una soluzione 1M di saccarosio. Sono state preparate diete con un rapporto amminoacidi/carboidrati pari a 1:5, 1:10, 1:100 e 1:500 e tutti e dieci gli amminoacidi sono stati aggiunti alla stessa concentrazione (Tab. 4.1). I controlli sono stati alimentati con una soluzione 1 M di saccarosio.

DIETA	AE TOTALI	AE SINGOLI
1:5	0,2	0,02
1:10	0,1	0,01
1:100	0,01	0,001
1:500	0,002	0,0002

Tabella 4.1 - Composizione in amminoacidi delle diete . AE totali indica la concentrazione totale di tutti gli amminoacidi (M); AE singola riporta la concentrazione dei singoli amminoacidi (M). Tutti gli amminoacidi sono stati sciolti in una soluzione di saccarosio 1 M (342g/ l).

4.2.3 Trattamento con imidacloprid

Per testare la risposta delle api a più fattori di stress, oltre a quello alimentare, sono state realizzate ulteriori prove, in cui ad ogni dieta è stato aggiunto l'imidacloprid. In particolare l'insetticida è stato inizialmente sciolto in acqua sterile a una concentrazione pari a 2 mM. Successivamente ad ogni dieta è stato aggiunto il neonicotinoide a una concentrazione finale di 10 nM.

4.2.4 Preparazione dei campioni

Per realizzare i nostri esperimenti sono stati prelevati da alveari in buona salute dei telaini con covata opercolata da cui sono state scrollate le api adulte. I telaini sono stati posti in un incubatore a una temperatura di 34°C all'80% di umidità relativa.

Dopo 12 ore sono stati preparati dei box contenenti ciascuno 30 api neosfarfallate, alle quali sono state fornite *ad libitum* le diete contenenti una diversa concentrazione di AE.

Per misurare l'impatto di più fattori di stress sulla salute delle api sono stati allestiti ulteriori box, in cui alle api sono state fornite diete con una differente concentrazione di amminoacidi ma con una costante concentrazione di imidacloprid.

4.2.5 Valutazione del tasso di sopravvivenza

Per studiare i possibili effetti sulla vitalità delle api di diete con differente concentrazione di amminoacidi, così come l'effetto delle diverse diete combinato ai pesticidi, per ogni trattamento è stato contato giornalmente il numero di api morte, che di volta in volta sono state allontanate dal resto degli insetti. Tutte le diete sono state cambiate giornalmente e l'esperimento è durato nel complesso 14 giorni. Ogni trattamento è stato realizzato in triplicato.

4.2.6 Valutazione del consumo di dieta

Per l'intera durata dell'esperimento quotidianamente ogni tubo, contenente le diverse diete, è stato sostituito con uno nuovo pieno. Per misurare il consumo di cibo, ogni tubo è stato pesato a intervalli di 24 ore; dalla differenza di peso abbiamo potuto calcolare il volume di cibo consumato giornalmente. Abbiamo inoltre tenuto conto della perdita di peso legato a fenomeni di evaporazione, ponendo dei tubi contenenti le diverse soluzioni in scatole vuote. Il consumo giornaliero di cibo per le diverse diete è stato ottenuto sommando i consumi giornalieri, aggiustati in funzione della quantità di soluzione evaporata. Questa cifra è stata poi divisa per il numero di api vive presenti in quel giorno. Il consumo totale di dieta per ape è stato quindi calcolato sommando l'effettivo consumo giornaliero di dieta per ape misurato per l'intera durata dell'esperimento.

4.2.7 Intake target

Per meglio comprendere gli aspetti multidimensionali della nutrizione abbiamo utilizzato il metodo denominato “The Geometric Framework”, in grado di elaborare predizioni quantitative che possano essere statisticamente valutate. Tale metodo si basa sul principio che tutti gli animali hanno bisogno di proporzioni specifiche di macronutrienti per ottenere prestazioni ottimali (Simpson e Raubenheimer, 2012). Quest’*optimum*, chiamato “Intake target”, può essere determinato sperimentalmente per una specie, utilizzando individui con caratteristiche omogenee (sesso, età, stato riproduttivo) (Raubenheimer e Simpson, 1997). Questo si ottiene sia limitando gli organismi a diete con proporzioni specifiche di macronutrienti che dando a questi una scelta di due diete con diversi rapporti di macronutrienti, e misurando la quantità di cibo che viene consumato (Simpson e Raubenheimer, 2012).

Nel nostro caso abbiamo valutato come le diverse concentrazioni di AE influenzano l’assunzione di cibo quando le api sono costrette ad alimentarsi su diete non bilanciate.

4.2.8 Valutazione dei livelli di DWV

Per determinare il possibile impatto di un’alimentazione con un eccesso di amminoacidi sulla risposta immunitaria delle api, abbiamo deciso di valutare l’effetto sul tasso di replicazione del DWV. A tale scopo, come descritto in precedenza, sono stati preparati dei box, ognuno contenete 30 api neosfarfallate, a cui è stato fornito *ad libitum* una dieta contenente solo saccarosio 1M (controllo) e una dieta con un rapporto amminoacidi/carboidrati pari a 1:5. Per studiare inoltre il possibile impatto di ulteriori fattori di stress, oltre a quello alimentare, sulla risposta immunitaria sono stati allestiti dei box in cui è stato aggiunto alla dieta l’imidacloprid, ad una concentrazione pari a 10 nM. Per eseguire le successive indagini molecolari, dopo 6 giorni dall’inizio dell’esperimento, sono state prelevate 5 api per ogni trattamento.

4.2.8.1 Estrazione RNA

Per estrarre l'RNA totale ogni singola ape è stata posta in tubi da 1,5 ml e omogenizzata, mediante l'uso di appositi pestelli, in 500 µl di TRIzol Reagent (Life Technologies), una soluzione monofasica di guanidina isotiocianato, fenolo e altri componenti in grado di inibire le ribonucleasi e di lisare le cellule. Il lisato così ottenuto è stato incubato per 3 minuti a temperatura ambiente, per permettere la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine, e sono stati successivamente aggiunti 100 µl di cloroformio. Dopo una vigorosa agitazione, i campioni sono stati incubati per altri 3 minuti a temperatura ambiente e successivamente sono stati centrifugati a 12000 x g per 10 minuti a 4°C per permettere la separazione del materiale insolubile, quale membrane extracellulari e polisaccaridi, e del DNA ad alto peso molecolare dall'RNA presente nella fase acquosa. Il supernatante, contenente RNA e frammenti di DNA a basso peso molecolare, è stato trasferito in una nuova provetta cui sono stati aggiunti 250 µl di isopropanolo, favorendo in questo modo la precipitazione dell'RNA. Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente i campioni sono stati centrifugati a 12000 x g per 15 minuti a 4°C. L'RNA precipitato, simile a una sorta di gel presente sul fondo della provetta, è stato lavato con 800 µl di Etanolo al 75% in acqua DEPC (acqua con dietilpirocarbonato, un potente inibitore delle RNasi). Dopo aver asciugato il pellet all'aria per circa 10 minuti, esso è stato risospeso in 50 µl di acqua DEPC.

Per determinare la concentrazione dei campioni e l'eventuale presenza di contaminanti, quali proteine e fenolo, l'RNA è stato analizzato mediante l'uso del Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo scientific). In particolare, attraverso una misurazione spettrofotometrica, è stato possibile analizzare l'RNA estratto partendo da volumi estremamente ridotti di campioni (2µl), determinando la concentrazione e il grado di purezza attraverso il rapporto 260/280 e 260/230. Mediante corsa elettroforetica dei campioni su gel di agarosio allo 0,8% in condizioni denaturanti è stata valutata l'integrità dell'RNA. I campioni sono stati infine conservati a -80° C.

4.2.8.2 Trattamento con DNasi I

Per rimuovere eventuali residui di DNA, l'RNA estratto è stato trattato con la Dnasi I (RNase-free) (Ambion), un'endonucleasi non specifica in grado di degradare la cromatina e i frammenti di DNA a singolo e doppio filamento. A tale scopo a 10 µg di RNA totale risospeso in 44 µl di acqua DEPC sono stati aggiunti 5 µl di Buffer 10X e 1 µl di DNasi I (2 U) ed è stata effettuata un'incubazione a 37°C per 30 minuti. Per inattivare la DNasi i campioni sono stati trattati con fenolo cloroformio alcool isoamilico. In particolare ai 50 µl di reazione sono stati aggiunti 50 µl di acqua DEPC e 100 µl di fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1) (Life Technologies). I campioni sono stati agitati brevemente e in seguito centrifugati a 13000 x g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato trasferito in nuovi tubi cui è stato aggiunto un decimo del volume di Na acetato 3 M e due volumi e mezzo di Etanolo 100 % e incubato overnight a -20°C, per permettere la precipitazione dell'acido nucleico. Dopo centrifugazione a 13000 x g per 15 minuti, l'RNA precipitato è stato lavato con etanolo al 75% in acqua DEPC, asciugato e risospeso in un volume di acqua DEPC pari a 20 µl. Mediante l'uso del Varioskan Flash Multimode Reader è stata determinata la concentrazione e la purezza dei campioni, successivamente conservati a -80°C.

4.2.8.3 qPCR

Per determinare il tasso di replicazione del DWV nell'intera ape è stata utilizzata la tecnica della qRT-PCR (Real Time quantitative-Reverse Transcription PCR). La Real-time PCR, nota anche come PCR quantitativa (qPCR), è una tecnica che permette la quantificazione dei prodotti di PCR nel momento stesso in cui questi compaiono nella miscela di reazione. Tale obiettivo è raggiunto grazie all'impiego di particolari sonde o coloranti fluorescenti che, legandosi al DNA, permettono di visualizzare in tempo reale il procedere della reazione. La fluorescenza aumenta in maniera proporzionale alla quantità di amplificato prodotto e, di conseguenza, è direttamente proporzionale alla quantità di template presente all'inizio della reazione. La determinazione della quantità di gene target è effettuata determinando il ciclo soglia (threshold cycle, Ct) della PCR, ossia quel ciclo nel

quale è raggiunto il valore soglia dell'intensità della fluorescenza. Solo in questa fase i segnali di amplificazione sono specifici e separabili dal rumore di fondo del sistema. L'analisi è quindi effettuata nella fase esponenziale della reazione, nella quale i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono ridotti al minimo. Il numero di cicli necessari affinché ogni campione raggiunga il proprio Ct è inversamente proporzionale al numero di copie del gene target presente all'inizio della reazione.

4.2.8.3.1 Disegno dei primer

Le coppie di primer utilizzate nelle reazioni di qRT-PCR (Tab. 4.2) sono state disegnate con il software Primer Express, versione 1.0 (PE Applied Biosystems), lasciando di default i parametri del software. In particolare sono stati scelti primer per il DWV e per l'actina, gene endogeno costitutivamente espresso in tutti i tessuti dell'ape, che ci ha permesso di normalizzare i risultati.

NOME	SEQUENZA 5'→ 3' (bp)
DWV For	GCG CTT AGT GGA GGA AAT GAA (21)
DWV Rev	GCA CCT ACG CGA TGT AAA TCT G (22)
β Actin For	GAT TTG TAT GCC AAC ACT GTC CTT (24)
β Actin Rev	TTG CAT TCT ATC TGC GAT TCC A (22)

Tabella 4.2 - Primer per la reazione di qRT-PCR. For indica Forward, Rev invece Reverse.

4.2.8.3.2 qRT-PCR

Le reazioni di quantificazione del numero di copie del DWV, realizzate utilizzando i primer mostrati nella Tabella 4.2, sono state condotte mediante il sistema "StepOne Real Time-PCR" a 96 pozzetti (Applied Biosystem). Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 20 μ l, utilizzando il SYBR-Green Real-Time qRT-PCR come consigliato dalla casa

produttrice (PE Applied Biosystems). In particolare, per ogni singolo campione è stata preparata la seguente mix (Tab. 4.3):

Reagente	Quantità	Concertazione finale
<i>Power</i> SYBR Green RT-PCR Mix (2X)	10 µl	1 X
Primer For (10 µM)	0,2 µl	100 nM
Primer Rev (10 µM)	0,2 µl	100 nM
RT-Enzyme Mix 125X	0,16 µl	1 X
H ₂ O	8,44 µl	

Tabella 4.3 - Reagenti utilizzati nella reazione di qRT-PCR. Tale mix è stata preparata sia con i primer per il DWV che per quelli della β -actina.

La miscela di reazione è stata brevemente agitata, spinnata e aliquotata nella piastra della real time. In ogni pozzetto sono stati infine aggiunti 150 ng di RNA, ottenuti come descritto precedentemente, risospesi in un volume finale di 1 µl. Per ogni reazione sono stati inclusi i controlli negativi, rappresentati da campioni privi di template o di enzima. Tutti i campioni sono stati caricati in triplicato.

Le condizioni d'amplificazione utilizzate sono state: 30 minunuti a 48°C, 10 minuti a 95°C, e 40 cicli di 25 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C (Tab. 4.4). Al termine dei cicli d'amplificazione è stata eseguita l'analisi della “melting curve” per escludere la presenza di prodotti aspecifici e di dimeri. I prodotti della qPCR sono stati inoltre caricati in un gel d'agarosio al 0,8%, come ulteriore controllo della specificità del prodotto di amplificazione.

Step	Numero cicli	Temperatura	Tempo
Hold Stage	1	48° C	30 minuti
(Retro trascrizione)		95° C	10 minuti

Cycling Stage (PCR)	40	95° C	15 secondi
		60° C	1 minuto
Melting Curve Stage	1	95° C	15 secondi
		60° C	1 minuto
		95° C	15 secondi

Tabella 4.4 - Ciclo standard della qRT-PCR.

4.2.8.3.3 Quantificazione assoluta

Per determinare la quantità assoluta di DWV sono stati messi in relazione i Ct, derivanti dalla media dei triplicati di ogni singolo campione, con l'equazione della curva standard assoluta. Per costruire tale curva è stato inserito nel vettore di clonaggio PCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) il frammento del virus purificato. In seguito si è proceduto trasformando i batteri, allestendo le mini-preparazioni mediante il Plasmid Mini Prep Kit" (Bio-Rad Hercules, CA) e le digestioni di controllo per verificare la correttezza del costrutto finale. Il clone batterico, contenente il costrutto esatto, è stato fatto crescere per una notte nel mezzo di coltura contenente antibiotico e successivamente è stato ottenuto il plasmide mediante purificazione. Attraverso la concentrazione molare e la massa molecolare del DNA plasmidico ricombinante è stato possibile determinare il numero di copie di questo. In particolare:

$$N.^{\circ} \text{ copie} = (\text{concentrazione di DNA}) \times (\text{volume della reazione}) \times (n.^{\circ} \text{ di Avogadro}, 6,022 \times 10^{23} \text{ molecole/mole}) / (\text{massa molare del plasmide ricombinante}).$$

Sono state poi eseguite diluizioni seriali del campione di DNA plasmidico, successivamente analizzate mediante qPCR. Mediante regressione lineare è stato possibile mettere in relazione i valori di Ct con il numero di copie di DWV. L'efficienza di amplificazione (E), dipendente dalla pendenza della curva standard, è stata calcolata in base alla seguente formula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/appendix/PCR_RTqPCR/Important%20Parameters%20of%20qPCR.pdf).

4.2.9 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite con l'ausilio del software IBM SPSS Statistic 21, Minitab (v. 16; Minitab, Inc, State college, Pennsylvania) e Prism v.5 (software GraphPad, San Diego, CA, USA), impostando il livello di significatività a 0.05. La normalità dei dati è stata verificata con test di Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, a seconda del numero di campioni. L'omoschedasticità è stata testata attraverso il test di Levene. L'impatto della dieta sulla sopravvivenza delle api è stato valutato utilizzando l'analisi di Kaplan-Meier e il test del long-rank. Il rischio di morte è stato analizzato attraverso il modello di regressione di Cox, con verifica di multicollinearità dei dati.

Il consumo quotidiano di cibo, espresso in mg / giorno / ape, è stato analizzato con la Mixed ANOVA (dieta x pesticidi x tempo, misure ripetute). Per studiare il consumo alimentare totale nei 14 giorni (espresso in ul / ape) è stato utilizzato il test ANOVA a una via e come post hoc il test di Bonferroni, mentre il test del *t* di Student è stato applicato al consumo alimentare (ul / ape) in presenza di pesticidi. Le differenze tra il consumo di aminoacidi e di saccarosio (mg / ape) nei 14 giorni di trattamento, in presenza o meno di pesticidi, sono state determinate attraverso un'analisi multivariata della varianza (MANOVA).

I risultati ottenuti dalla quantificazione assoluta dei livelli di DWV nei campioni nutriti con solo saccarosio e quelli nutriti con una dieta 1:5 sono stati confrontati attraverso il test del *t* di Student. Il confronto del titolo virale in campioni esposti a più fattori di stress, oltre a quello alimentare, è stato eseguito attraverso un altro test parametrico, quale l'ANOVA a una via.

4.3 RISULTATI

4.3.1 Valutazione del tasso di sopravvivenza

Come primo passo per valutare gli effetti di un diverso regime alimentare sulla salute delle api, abbiamo confronto i tassi di sopravvivenza di gruppi di giovani

api nutrite *ad libitum* con diete con un diverso apporto di AE. Come si nota in Figura 4.1, nei primi giorni dall'inizio dell'esperimento non si rilevano differenze di vitalità tra i gruppi di api nutriti con un diverso apporto di amminoacidi. Con il proseguire della fase sperimentale e con l'aumento della concentrazione di AE osserviamo differenze nella vitalità tra i trattati. Particolarmente interessanti sono le curve ottenute dai dati ricavati dalle api nutrite con le più alte dosi di AE (1:5 e 1:10): in questo caso, come conferma l'analisi statistica, osserviamo una significativa differenza della durata della vita dei campioni sottoposti a tale regime alimentare rispetto a tutti gli altri trattati (Kaplan-Meier analysis: dieta 1:5 $\chi^2=15.946$, $P < 0.001$, $df = 1$; dieta 1:10 $\chi^2 = 4.911$, $P < 0.05$, $df = 1$). Si nota in particolare una significativa differenza tra i campioni nutriti con una dieta 1:5 e i controlli nutriti con solo saccarosio, con un aumento significativo del rischio di morte (COXREG: dieta 1:5 vs controllo HR = 18.211 [95% CI 2.412-137.516], $P = 0.005$, $df = 1$).

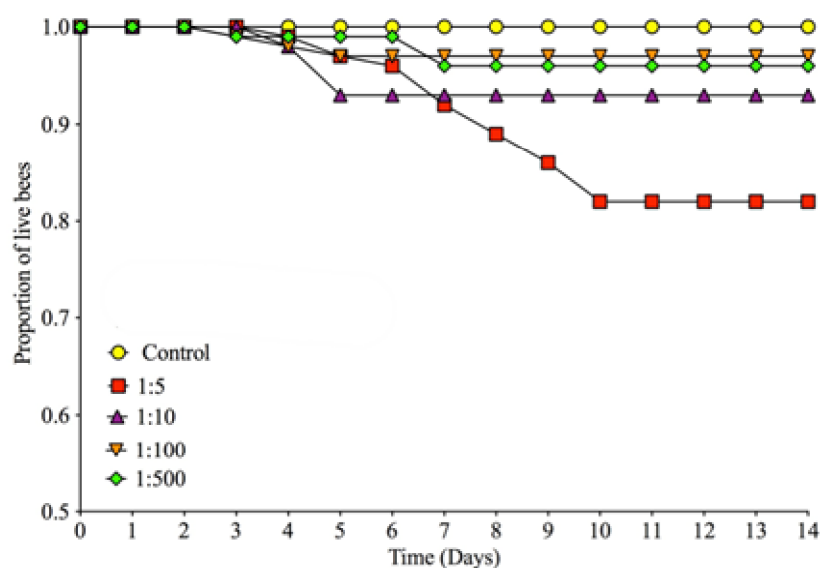


Figura 4.1 - Vitalità di api sottoposte a un diverso regime alimentare. Ogni punto rappresenta la media del rapporto tra il numero di api vive e quello di api totali presenti all'inizio dell'esperimento, ottenuti da tre prove condotte indipendentemente.

Per valutare l'azione di più fattori di stress sulla salute delle api, abbiamo esaminato gli effetti della dieta sulla sopravvivenza di api esposte ad imidacloprid.

Dai dati mostrati in Figura 4.2 emerge che le api nutrite con diete ricche di AE ed esposte al neonicotinoide presentano una riduzione della longevità. In particolare i campioni nutriti della dieta 1:5 e 1:10, contenente imidacloprid, mostrano una significativa riduzione della durata della vita rispetto a tutte le altre tesi. (Kaplan-Meier analysis: dieta 1:5 + imidacloprid $\chi^2 = 37.647$, $P < 0.001$, $df = 1$; dieta 1:10 + imidacloprid $\chi^2 = 15.721$, $P < 0.001$, $df = 1$). Si nota la significativa differenza di tali campioni rispetto ai controlli, esposti allo stesso neonicotinoide ma nutriti con solo saccarosio, che mostrano un aumento significativo del rischio di morte (COXREG; 1:5+ imidacloprid vs Controllo+ imidacloprid HR = 42.0955 [95% CI 5.792-318550], $P < 0.001$, $df = 1$; 1:10 + imidacloprid vs Controllo+ imidacloprid HR = 19.613 [95% CI 2.596-148.197], $P = 0.004$, $df = 1$).

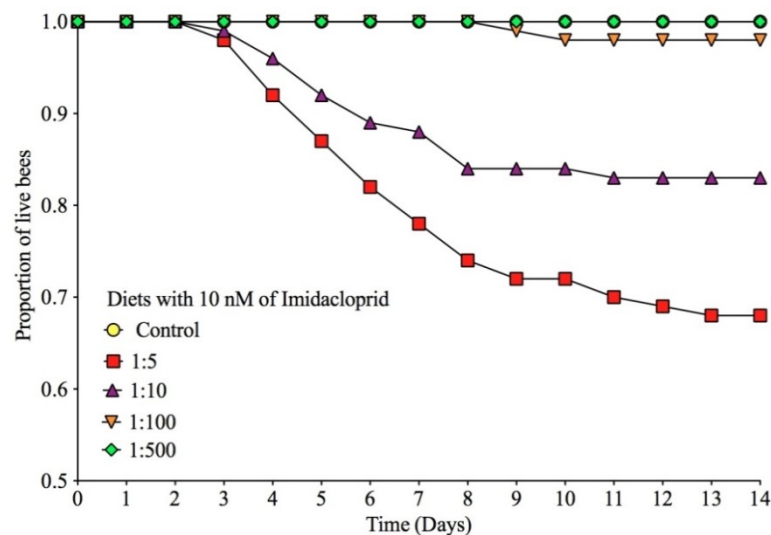


Figura 4.2 - Vitalità di api sottoposte a un diverso regime alimentare ed esposte ad imidacloprid. Ogni punto rappresenta la media del rapporto tra il numero di api vive e quello di api totali presenti all'inizio dell'esperimento, ottenuti da tre prove condotte indipendentemente.

Se confrontiamo i risultati di questi ultimi due grafici, possiamo trarre un'ulteriore informazione circa l'effetto concomitante di più fattori di stress. L'analisi statistica rivela infatti come le api nutrite con diete 1:5 e 1:10 ed esposte ad imidacloprid mostrano una differenza significativa della durata della vita rispetto ai campioni sottoposti allo stesso regime alimentare ma non esposti al neonicotinoide (Kaplan-Meier analysis: dieta 1:5 vs dieta 1:5 + imidacloprid, $\chi^2 =$

6.583, $P = 0.010$, $df = 1$; dieta 1:10 vs dieta 1:10 + imidacloprid, $\chi^2 = 3.961$, $P = 0.047$, $df = 1$). Particolarmente significativi sono i dati ottenuti dal confronto tra le diete 1:5, che evidenziano come il rischio di morte quasi raddoppi in seguito ad aggiunta del neonicotinoide (COXREG; dieta 1:5 vs dieta 1:5+imidacloprid, $HR = 2.156$ [95% CI 1.170-3.973], $P = 0.014$, $df = 1$); ciò significa che l'ape nutrita con una dieta 1:5 ha il 68% di probabilità in più di morire se nella dieta è aggiunto l'imidacloprid.

4.3.2 Valutazione del consumo di dieta

Valutando il consumo medio giornaliero di soluzione nutritiva, possiamo inoltre constatare come api confinate a specifiche diete assumono diverse quantità di AE e di saccarosio (MANOVA analysis: $V = 0.823$, $F = 10.381$, $P < 0.001$). In particolare si osserva come la diversa composizione delle diete abbia effetti significativi soprattutto sull'ingestione di amminoacidi e la nutrizione ottimale (Food Intake Target o IT), data dal consumo minimo di cibo, è rappresentata dalla soluzione nutritiva con rapporto amminoacidi/saccarosio 1:10 (MANOVA analysis: $F = 24.324$, $P < 0.001$) (Fig. 4.3).

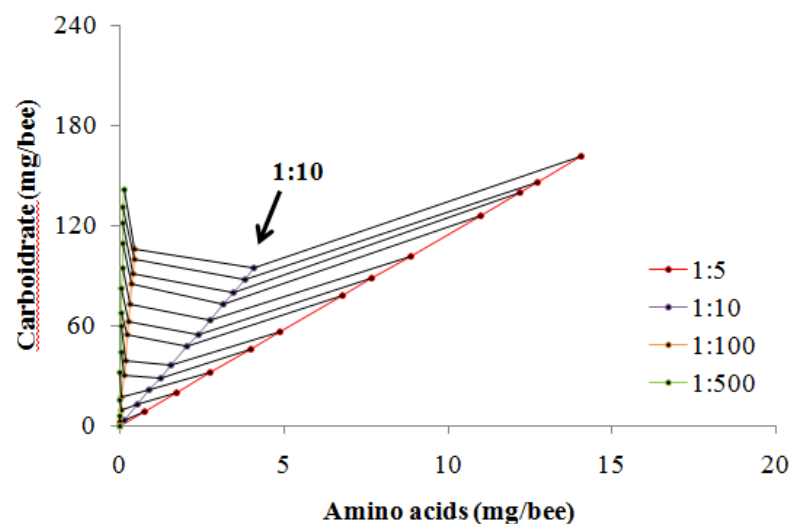


Figura 4.3 - Proporzione di amminoacidi e saccarosio assunti da api sottoposte a diverso regime alimentare. Ogni punto rappresenta la media giornaliera di carboidrati (saccarosio) e amminoacidi consumati da ogni singola ape. La freccia indica l'IT.

Un interessante dato è stato ottenuto anche dal confronto tra la quantità totale di cibo ingerito dalle api sottoposte a diete con un diverso contenuto di AE. Dai nostri esperimenti emerge come la concentrazione di AE influenzi il comportamento alimentare (Fig. 4.4). Possiamo infatti osservare come il volume di soluzione ingerito dipenda dalla concentrazione di AE; esso risulta significativamente diverso per tutte le tesi analizzate (One-Way ANOVA $F=276.930$, $P < 0.001$) (Bonferroni post hoc test $P < 0.05$).

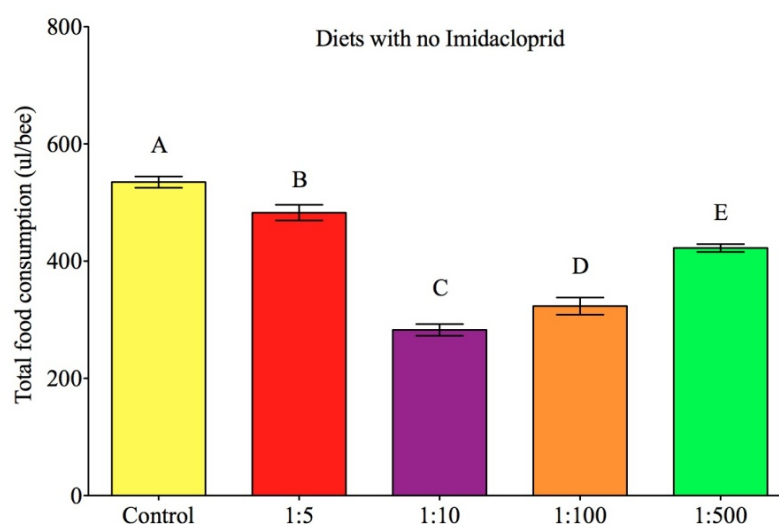


Figura 4.4 - Volume totale di dieta consumata da api sottoposte a diverso regime alimentare.

Il consumo di soluzione alimentare è espresso come μl di dieta consumata da una singola ape durante l'intero periodo sperimentale.

Considerando il consumo giornaliero medio di saccarosio e di amminoacidi da parte di api sottoposte a diverso regime alimentare ed esposte ad imidacloprid, possiamo notare differenze soprattutto nella quantità di AE ingeriti (MANOVA analysis: $V = 0.823$, $F = 10.381$, $P < 0.001$). L'IT in seguito all'esposizione ad imidacloprid è dato dalla dieta 1:100 (MANOVA analysis $F = 21.713$, $P < 0.001$) (Fig. 4.5).

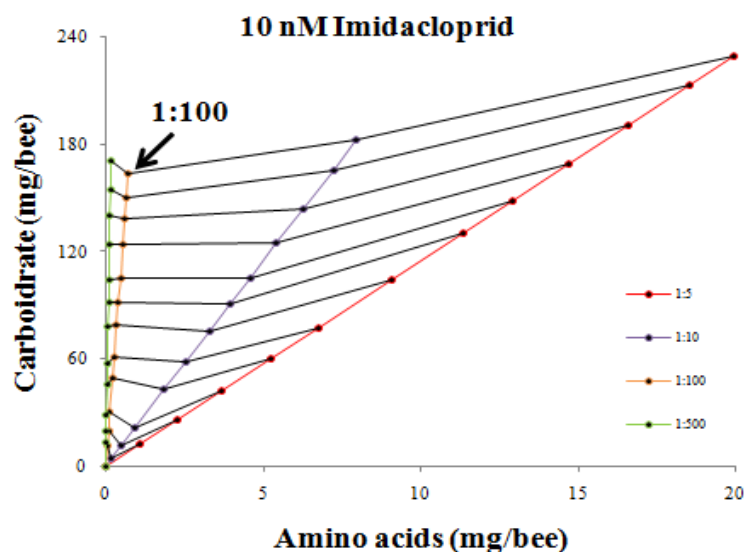


Figura 4.5 - Proporzione di amminoacidi e saccarosio assunti da api sottoposte a diverso regime alimentare ed esposte ad imidacloprid. Per le diverse diete ogni punto è ottenuto dalla media giornaliera di carboidrati (saccarosio) e amminoacidi consumati da ogni singola ape. La freccia indica l'IT.

Considerando il volume medio di dieta ingerito nel corso di tutta la fase sperimentale da un'ape esposta a una diversa concentrazione di AE in presenza di un neonicotinoide, abbiamo potuto constatare alterazioni nel comportamento alimentare (Fig. 4.6). Infatti, tenendo presente che le diete considerate hanno un uguale concentrazione di saccarosio, possiamo notare che l'aggiunta del neonicotinoide influenza l'assunzione di cibo, che diviene uguale per quasi tutte le diete. Un'eccezione è data dalla dieta 1:5: la contemporanea presenza di elevate concentrazioni di AE e di imidacloprid spinge le api a un maggior consumo di soluzione alimentare, che risulta essere significativamente più alta rispetto a quella di tutte le altre tesi sperimentali (One-Way ANOVA $F = 16.085$, $P < 0.001$; Bonferroni post hoc test, dieta 1:5 vs tutte le altre diete $P < 0.05$).

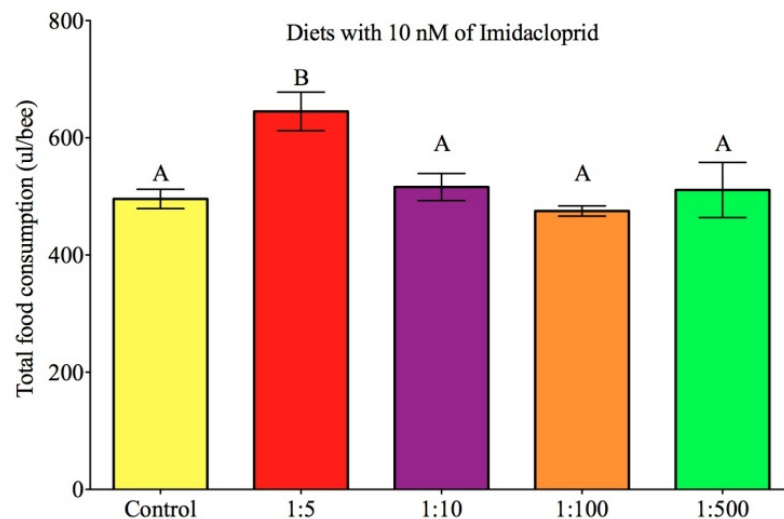


Figura 4.6. - Volume totale di dieta consumata da api sottoposte a diverso regime alimentare ed esposte ad imidacloprid. Il consumo di soluzione alimentare è espresso come μl di dieta consumata da una singola ape nel corso dell'intero periodo sperimentale.

Basandosi sul test statistico “Mixed ANOVA”, considerando 3 variabili indipendenti (dieta x tempo x insetticida), possiamo dedurre che anche il tempo ha un significativo effetto sull'assunzione di cibo (Mixed ANOVA: $\chi^2 = 86.143$, $P = 0.058$). Confrontando il consumo giornaliero medio delle api, in presenza o meno dell'insetticida, possiamo valutare anche l'effetto dell'interazione tra dieta ed imidacloprid. Infatti dalla Figura 4.7A emerge una differenza nel consumo medio di dieta a seconda delle concentrazioni di AE, sia in presenza che in assenza dell'insetticida (Two-Way ANOVA: $F = 46.546$, $p < 0.001$). Dalla Figura 4.7B, dove sono riportate le differenze di consumo per le varie diete (delta), si osserva inoltre come dopo l'aggiunta dell'imidacloprid vi sia una diversa variazione del volume di sostanza nutritiva ingerita a seconda della dieta (Two-Way ANOVA: $F = 26.109$, $P < 0.001$).

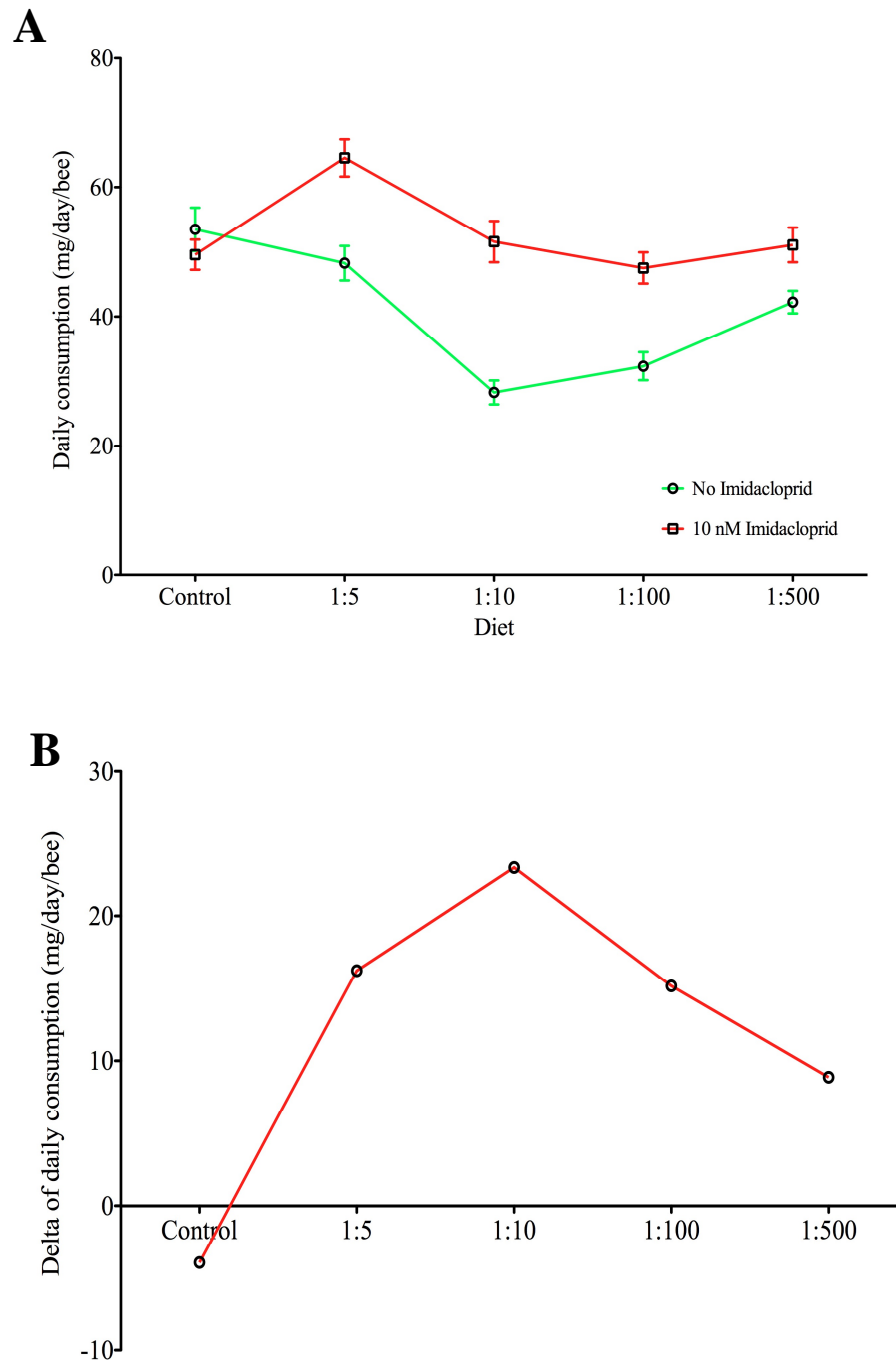


Figura 4.7 - Volume medio di dieta ingerito giornalmente dalle api in presenza o meno di imidacloprid. (A) Il consumo, espresso come mg di dieta consumata da una singola ape al giorno, è ottenuto dalla media di tre esperimenti condotti separatamente. (B) L'interazione tra dieta ed imidacloprid è rappresentata attraverso la differenza della quantità di cibo consumato giornalmente dalle api in presenza o meno dell'insetticida.

Osservando i dati riportati in Figura 4.8 possiamo notare differenze nel consumo medio di cibo tra le diete con e senza neonicotinoide. In particolare si nota come

l'aggiunta di imidacloprid determini un significativo aumento del volume di soluzione ingerito dalle api (t-student test: $t = -3.633$, $P = 0.001$)

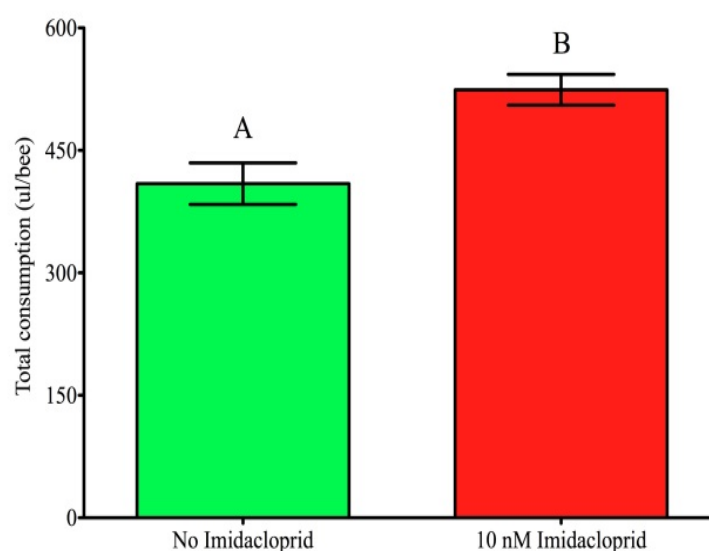


Figura 4.8 - Consumo di dieta in presenza o meno di imidacloprid. I dati riportati nell'istogramma rappresentano la media della somma dei volumi ingeriti per tutte le tesi testate, in presenza o meno dell'insetticida.

4.3.3 Valutazione dei livelli di DWV

Per valutare l'effetto della nutrizione sull'immunocompetenza delle api, abbiamo misurato i livelli di DWV nelle api nutrite con la più alta concentrazione di AE testata (1:5) e che mostravano il minor tasso di sopravvivenza. In particolare abbiamo misurato i livelli di virus dopo 6 giorni dall'inizio dell'esperimento, quando iniziavano a palesarsi le differenze di vitalità tra i gruppi di api nutriti con diverse diete. Come si nota dalla Figura 4.9, l'eccessivo consumo di amminoacidi influenza negativamente la risposta immunitaria e ciò si riflette in un aumento del titolo del virus.

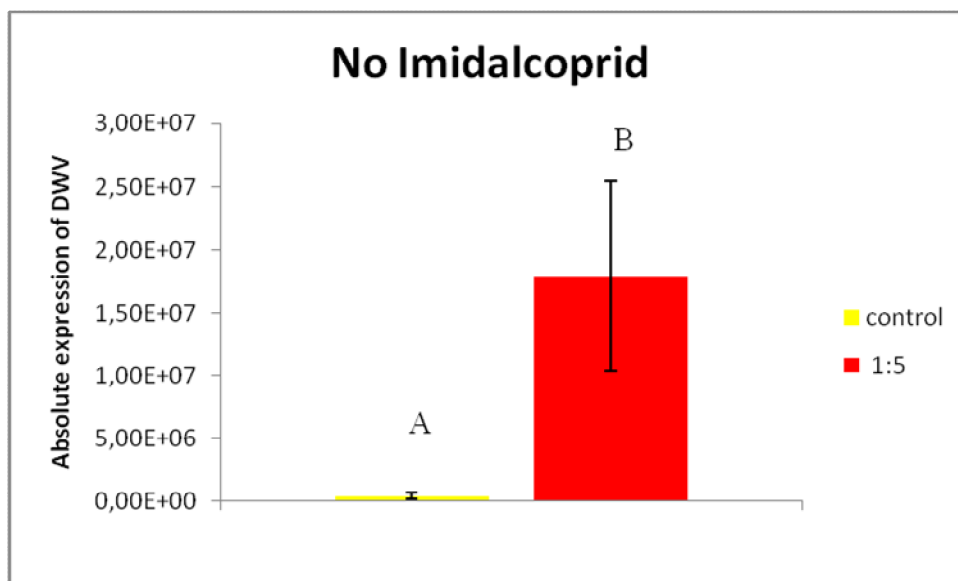


Figura 4.9 - Espressione dei livelli di DWV in api sottoposte a un regime alimentare ricco di AE. Quantificazione assoluta del numero di copie di DWV presenti nelle api al sesto giorno di trattamento. Le barre di errore esprimono la deviazione standard (t student test: $t=5.155$, $df=8$, $P < 0.005$).

Abbiamo misurato inoltre il titolo virale delle api nutrite con un'elevata concentrazione di amminoacidi ed esposte a dosi subletali di imidacloprid. Anche in presenza del neonicotinoide possiamo notare un significativo aumento del titolo virale nelle api sottoposte a una dieta 1:5 rispetto ai controlli esposti all'insetticida ma nutriti con solo saccarosio (Fig. 4.10)

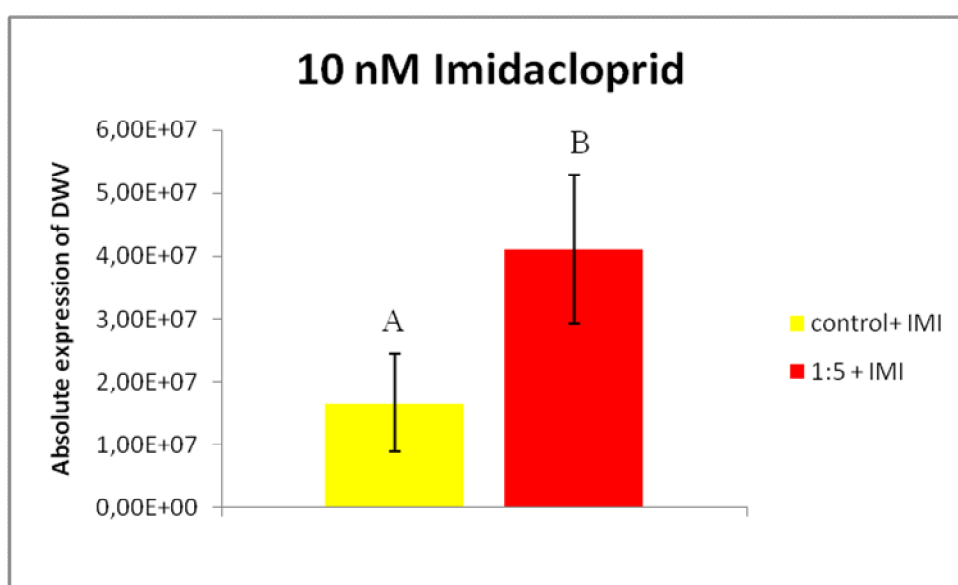


Figura 4.10 - Espressione dei livelli di DWV in api sottoposte a un regime alimentare ricco di AE ed esposte ad imidacloprid. Quantificazione assoluta del numero di copie di DWV presenti nelle api al sesto giorno di trattamento. Le barre di errore esprimono la deviazione standard (t student test: $t=3.872$, $df=8$, $P < 0.005$).

Dal confronto di tutti i campioni possiamo ricavare un'ulteriore informazione circa l'effetto di più fattori di stress. Se osserviamo la Figura 4.11 possiamo notare come la presenza di un singolo fattore di stress, sia esso lo stress nutrizionale o il neonicotinoide, determina un aumento significativo dei livelli di virus rispetto ai campioni nutriti con solo saccarosio e non esposti ad imidacloprid. La presenza concomitante dei 2 fattori di stress induce un ulteriore calo delle difese immunitarie, come si deduce dall'ulteriore aumento del titolo virale, che risulta essere significativamente maggiore rispetto a quello di tutte le altre tesi sperimentali.

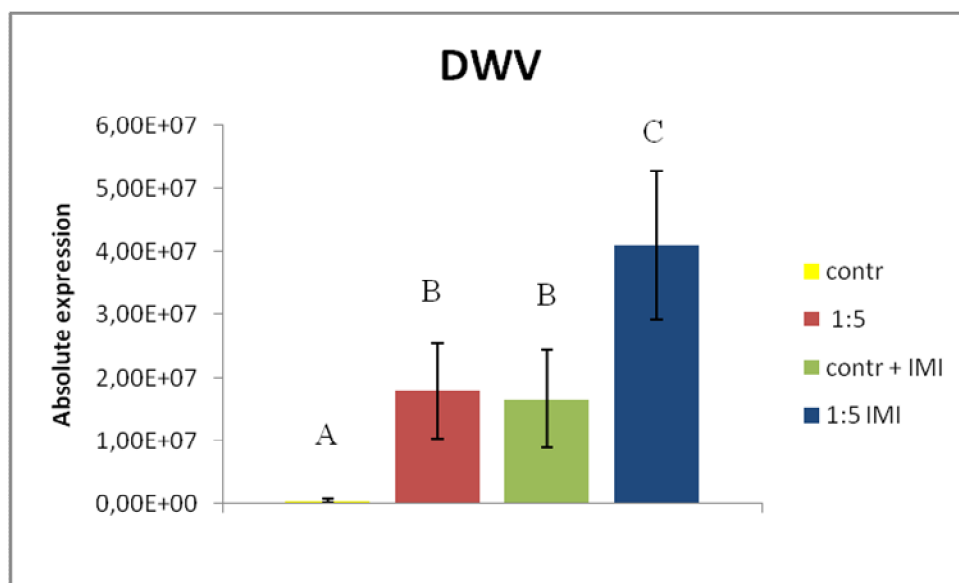


Figura 4.11 - Espressione dei livelli di DWV in api sottoposte a un regime alimentare ricco di AE ed esposte o meno all' imidacloprid. Quantificazione assoluta del numero di copie di DWV presenti nelle api al nono giorno di trattamento. Le barre di errore esprimono la deviazione standard (One-Way ANOVA $F= 21.743$, $d=3$, $P < 0.0001$; Post hoc test Tukey $P<0.05$).

4.3 DISCUSSIONE

Antichi detti popolari quali “una mela al giorno toglie il medico di turno” o il più british “feed a cold, starve a fever” suggeriscono l’esistenza di un legame tra risposta immunitaria e nutrizione che, benché nel tempo sia stato studiato in organismi di diversi *phyla*, rimane ancora oggi non del tutto compreso. In questo quadro acquistano ancor più valore i dati presentati in questo capitolo che dimostrano l’influenza della dieta sia sullo stato di benessere e sul comportamento alimentare delle api sia sulla capacità di far fronte ad ulteriori fattori di stress.

Dai nostri dati emerge come la composizione della dieta possa influenzare la durata media della vita delle api: maggiore è il contenuto di AE maggiore è il rischio di morte. Tale risultato trova conferma nei dati presenti in letteratura che dimostrano come le api operaie muoiano a un ritmo più veloce quando sono costrette a consumare diete ad alto contenuto di proteine (Pirk *et al.*, 2010). Se da un lato questo dato può sorprendere, visto il ruolo fondamentale degli amminoacidi nei processi fisiologici e riproduttivi, dall’altro lato fa riflettere sulla possibile tossicità legata ad un eccessivo consumo di amminoacidi. Dai nostri dati emerge infatti che la maggiore mortalità non è legata a un mancato consumo della dieta, ma alla presenza dei AE. Anzi le api costrette a nutrirsi con una dieta ricca di amminoacidi consumano più cibo rispetto alle altre. L’eccesso di amminoacidi ingeriti potrebbe avere effetti dannosi a causa della non sufficiente eliminazione delle molecole di scarto prodotte dal metabolismo degli amminoacidi, quali ammoniaca e acido urico.

Fornendo alle api diete con diversa concentrazione di AE possiamo osservare come l’*optimum* nutrizionale (intake target) corrisponda alla dieta 1:10 che, considerando la sterilità delle api operaie, rappresenta la dieta necessaria a far fronte esclusivamente alle funzioni somatiche. Dobbiamo tener presente che quando un organismo viene alimentato con diete sbilanciate, questo si nutre in modo da non eccedere in nessuno dei macronutrienti disponibili riuscendo contestualmente a far fronte alle esigenze corporee (Raubenheimer e Simpson, 1997). Dai nostri dati emerge che la dieta 1:10 rappresenta la dieta a cui è associata il minor contenuto di AE che permette alle api di assumere la minima quantità di carboidrati di cui hanno bisogno.

Attraverso i nostri risultati abbiamo inoltre dimostrato come la diversa concentrazione di AE influenzi la risposta dell'ape ad ulteriori fattori di stress dati, ad esempio, dall'esposizione ai pesticidi. Alcuni studi hanno dimostrato come la composizione della dieta possa influenzare la resistenza ai pesticidi, inducendo anche la sintesi di enzimi con funzione detossificante (Schmehl *et al.*, 2014). Dai nostri esperimenti è emerso che, anche in seguito ad un'esposizione cronica a dosi subletali di imidacloprid, il rischio di morte aumenta all'aumentare della concentrazione di AE. In questo caso però la presenza dell'insetticida riduce significativamente la durata di vita delle api sottoposte a dieta 1:5 e 1:10 rispetto ai campioni alimentati con la stessa dieta ma non esposti ad imidacloprid. Questo fenomeno dipende dal fatto che i danni indotti dagli stress nutrizionali possono essere esacerbati dalla presenza di pesticidi. Questo perché, ad esempio, accanto alla sovraespressione dei geni di disintossicazione, in seguito ad esposizione ad imidacloprid, vi è un'inibizione dell'espressione dei geni associati alla glicolisi e ad altri processi metabolici (Berenbaum e Johnson, 2015). Se consideriamo i mg di amminoacidi e carboidrati assunti dalle api, notiamo inoltre un cambiamento dell'intake target a favore di una dieta con una minore concentrazione di AE. Emerge infatti come, in presenza del neonicotinoide, l'*optimum* corrisponda alla dieta 1:100. Le cause di tale cambiamento potrebbero risiedere in un'alterazione nelle esigenze fisiologiche.

Le api consumano una maggiore quantità di cibo contaminato indipendentemente dalla dieta. Una possibile spiegazione è che le api diventino dipendenti dal cibo contenente neonicotinoidi anche a causa di alterazioni fisiologiche (Kessler *et al.*, 2015). L'aumento del consumo di cibo non è costante tra le varie diete ma sembra essere influenzato dal contenuto di AE. Interessante è però notare come tra le diverse diete, sia in presenza che in assenza di insetticida, vi sia un maggiore consumo della soluzione 1:5. Questo dato è piuttosto sorprendente alla luce del fatto che vi è un aumento del consumo della dieta che con maggiore probabilità induce alla morte. Per comprendere la natura di questo risultato saranno necessari ulteriori studi che valutino se alla base di questo fenomeno vi siano alterazioni fisiologiche, capaci di creare una sorta di assuefazione agli amminoacidi, o se invece questa scelta nutritiva sia dettata dalle intrinseche esigenze corporee, come la difesa attraverso la sintesi di peptidi coinvolti nella risposta allo stress quali, ad

esempio, gli AMP che nelle api sono sintetizzati proprio a partire dalle proteine presenti nel polline (Yi *et al.*, 2014).

E' noto infatti come la nutrizione sia critica per l'espressione delle difese immunitarie e la resistenza ai patogeni con conseguenze che pesano su salute, benessere e successo riproduttivo degli individui. Per contro, la sovranutrizione e i disordini metabolici ad essa associati possono compromettere la funzionalità delle difese immunitarie, distruggere la relazione col microbiota simbiote e commensale e aumentare la suscettibilità alle malattie infettive (Amar *et al.*, 2007).

Dai nostri risultati è infatti emerso che la composizione della dieta influenza non solo le scelte alimentari e la sopravvivenza, ma anche la risposta immunitaria e la capacità di far fronte a ulteriori fattori di stress, dati appunto dall'esposizione all'imidacloprid. Esponendo le api a diete con elevati livelli di AE o al neonicotinoide osserviamo un aumento dei livelli di DWV, indice di un'alterazione della risposta immunitaria. Per comprendere tale risultato dobbiamo tener presente che nelle api i livelli di DWV sono mantenuti sotto controllo dall'azione del sistema immunitario che, anche attraverso l'attivazione di difese dipendenti da NF- κ B, combatte l'infezione virale (Nazzi e Pennacchio, 2014). Tale fattore di trascrizione è bersaglio dell'azione immunosoppressiva indotta dai neonicotinoidi che, mediante una regolazione positiva dell'espressione di alcuni membri della famiglia delle proteine LRR, ne inibiscono l'attivazione (Di Prisco *et al.*, 2013). Dai risultati ottenuti è emerso che, come nel caso di sostanze neurotossiche, anche lo stress nutrizionale altera significativamente la capacità dell'ape di frenare la replicazione virale probabilmente agendo, in maniera diretta o indiretta, sull'attivazione di NF- κ B. Nelle api esposte ad entrambi i fattori di stress l'azione immunosoppressiva di questi sembra sommarsi, come evidenziato dall'ulteriore aumento del titolo virale. Questi dati lasciano supporre che, benchè la presenza di proteine nella dieta sia fondamentale per lo sviluppo delle difese dell'organismo, un eccesso di queste rappresenti uno stress che altera la risposta immunitaria e grava sulla capacità dell'ape di far fronte ad ulteriori fattori di stress. Ciò è in linea con il modello proposto da Nazzi *et al.* (2012), che prevede la possibilità che ulteriori agenti di stress, come nel nostro caso regimi alimentari inadeguati, similmente all'azione della *Varroa*, influenzino

il sistema immunitario, interferendo con il delicato equilibrio che presiede alle infezioni virali latenti.

Dai nostri risultati emerge quindi la complessità della relazione tra composizione della dieta e stato di benessere dell'ape e la necessità di ulteriori studi volti a chiarire quali siano i pathway molecolari coinvolti nell'interazione tra nutrizione e risposta immunitaria. Dalla maggiore comprensione di queste relazioni potremmo ricavare informazioni utili per determinare le condizioni tali da assicurare, anche attraverso un'adeguata dieta, il maggior benessere di quest'insetto.

CAPITOLO V: I NEONICOTINOIDI

5.1 INTRODUZIONE

Gli agrofarmaci rappresentano un ampio gruppo di sostanze chimiche eterogenee utilizzate per il controllo di malattie e parassiti in campo agricolo. Tuttavia, a seconda della natura e del meccanismo d'azione, possono anche arrecare danni più o meno gravi ad organismi non target (EASAC, 2015). Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione per i possibili effetti tossici derivanti dall'uso di particolari agrofarmaci, quali gli insetticidi neonicotinoidi che rappresentano tra questi una delle più vendute categorie, tanto da coprire circa un quarto del mercato mondiale di insetticidi, utilizzati in quasi 120 paesi per più di 1000 impieghi (Van der Sluijs JP *et al.*, 2013). Come evidenziato nei capitoli introduttivi, numerose ricerche hanno dimostrato l'impatto negativo di queste sostanze neurotossiche sulla salute delle api, mostrando come queste siano una delle principali cause del declino delle colonie a cui stiamo assistendo negli ultimi anni. In particolare, recenti studi hanno messo in luce che i neonicotinoidi possono influenzare negativamente la risposta immunitaria sotto il controllo del fattore di trascrizione NF- κ B (Di Prisco *et al.*, 2013). Altri studi hanno anche analizzato i possibili danni di tali sostanze sulla salute dei mammiferi evidenziando, ad esempio, come l'esposizione dei ratti ad elevate dosi di clothianidin (CLT) determini un deterioramento delle funzioni cognitive (Ozdemir *et al.*, 2014). Nei mammiferi i neonicotinoidi possono agire a diversi livelli poiché i recettori nicotinici dell'acetilcolina sono presenti non solo nelle cellule nervose, ma anche negli adipociti, macrofagi, linfociti, cheratinociti, cellule epatiche, dendritiche e cellule epiteliali intestinali (Gahring e Rogers, 2006; Abou-Donia *et al.*, 2008). Il CLT ha inoltre effetti citogenetici, genotossici, neurotossici e può determinare alterazioni nello sviluppo embrionale (Abou-Donia *et al.*, 2008). Tuttavia, a fronte di tutti questi studi, restano ancora diversi interrogativi sulla completa ed effettiva conoscenza dell'immunotossicità di tali sostanze.

Questa parte del lavoro punta ad un'ulteriore caratterizzazione degli effetti dei neonicotinoidi sull'immunocompetenza delle api, attraverso la valutazione della risposta di incapsulamento e melanizzazione in seguito a trattamento con CLT, in

quanto queste componenti di difesa sono in parte sotto il controllo NF- κ B (Lemaitre e Hoffman, 2007).

Poiché questi pathway di risposta immunitaria sotto il controllo di NF- κ B sono molto conservati, abbiamo voluto valutare l'impatto dei neonicotinoidi in organismi superiori, utilizzando una linea cellulare monocitaria umana (cellule THP1). Tale linea cellulare rappresenta un valido modello sperimentale per lo studio dei meccanismi che regolano la risposta immunitaria dei mammiferi. L'uso di queste cellule fornisce, infatti, una serie di vantaggi rispetto alle altre linee cellulari derivanti da monociti e macrofagi, quali l'elevato tasso di crescita, la facilità e la sicurezza dell'uso e l'omogeneo background genetico, che ne hanno fatto un sistema ampiamente utilizzato per gli studi *in vitro* finalizzati a valutare, come nel nostro caso, gli effetti legati all'uso di sostanze xenobiotiche (Chanput *et al.*, 2014).

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Valutazione degli effetti del CLT su api adulte

5.2.1.1 Materiale biologico

Gli studi volti a valutare l'effetto del CLT sulla risposta immunitaria delle api sono stati eseguiti su *A. mellifera* L. tenuta in allevamento presso l'apiario sperimentale del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Maggiori dettagli circa il trattamento degli apiari sono riportati nel paragrafo 4.2.1.

5.2.1.2 Preparazione dei campioni

Per realizzare i nostri esperimenti sono stati prelevati da alveari in buona salute dei telaini con covata opercolata da cui sono state scrollate le api adulte. I telaini sono stati posti in un incubatore a una temperatura di 34°C e 80% di umidità relativa.

Dopo circa 12 ore sono state prelevate 50 api neosfarfallate, divise in gruppi da 10. Ogni ape è stata trattata individualmente con 1 µl di acetone, applicato sul torace, contenenti quantità crescenti di CLT (2, 5, 10 e 20 ng). Il gruppo controllo è stato invece trattato con 1µl di acetone privo di CLT. Le api appartenenti allo stesso gruppo sperimentale sono state trasferite in box isolati all'interno dell'incubatore e alimentate con saccarosio 1 M. Tutti i trattamenti sono stati realizzati in triplicato.

5.2.1.3 Test di incapsulamento e melanizzazione

Per valutare il possibile impatto del CLT sul sistema immunitario delle api, abbiamo esaminato a livello fenotipico come la risposta immunitaria varia in seguito al trattamento con dosi crescenti di tale neonicotinoide. Per questo motivo, 1 ora dopo il trattamento con CLT, realizzato come descritto precedentemente, abbiamo anestetizzato le api con CO₂ e impiantato nella cavità toracica, tra il III e il IV uro-tergite, un frammento di nylon sterilizzato ai raggi UV, lungo 5 mm e spesso 0,08 mm, per una profondità di circa 2 mm, mediante l'ausilio di uno stereomicroscopio ad un ingrandimento 20x (Zeiss, Discovery V8). Le api sono state poi ricollocate nei box di partenza e poste nell'incubatore. Sono state scartate le api che, inseguito all'impianto del nylon, evidenziavano perdita di emolinfa. Dopo 24 ore gli impianti sono stati rimossi dall'addome delle api e fotografati al microscopio ottico ad un ingrandimento 400x (Zeiss, Axioskop).

Le immagini degli impianti sono state sottoposte all'analisi della scala dei grigi. In particolare, con l'ausilio del programma GIMP v. 2.8 (GNU Image Manipulation Program, www.gimp.org), sono stati esportati il numero totale dei pixel, il numero dei pixel diversi da quelli bianchi e la media della distribuzione

dei pixel diversi da quelli bianchi. Quest'ultima misura rappresenta la media della gamma di grigi della foto (m), valore che va da 0 a 255 dove 0 significa nero e 255 bianco (Fig. 5.1) (Mongiardino *et al.*, 2012).

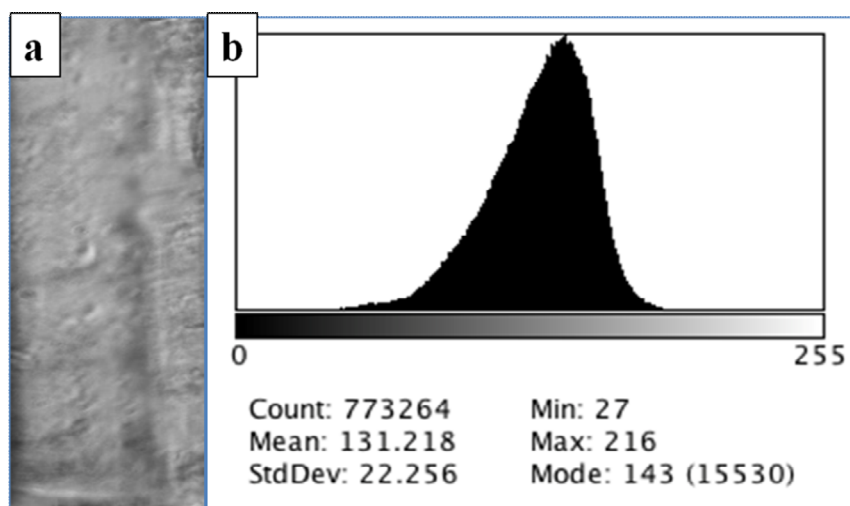


Figura 5.1 – Esempio di dati esportati dal programma GIMP v. 2.8.(a) Immagine di un impianto; (b) istogramma con i dati relativi all'analisi dei pixel dell'immagine.

L'indice d'incapsulamento (% di copertura di emociti) è stato calcolato secondo la formula:

$$EI(\%) = (\text{n. di pixel diversi dai bianchi} / \text{pixel totali}) * 100.$$

L'indice di melanizzazione (in percentuale) è dato dalla formula:

$$MI(\%) = [(1 - m) / 255] * 100.$$

5.2.2 Esperimenti *in vitro* su culture cellulari umane

5.2.2.1 Colture cellulari

Gli esperimenti descritti in questa sezione sono stati realizzati utilizzando la linea cellulare monocitaria umana THP-1 (ATCC TIB-202), derivante da pazienti affetti da leucemia mieloide acuta. Queste cellule sono state fatte crescere in flask da 75 cm² di superficie e mantenute in coltura utilizzando un terreno “Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640” (Life technologies) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS) (v/v), glutammina 2 mM e

penicillina/streptomicina 100 U/ml. Le cellule sono state fatte crescere in un incubatore per colture a una temperatura di 37° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Quando a confluenza, le cellule sono state risospese in nuove flask in modo da non avere mai una concentrazione superiore a 10⁶ cellule/ml. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni due giorni.

Per realizzare gli esperimenti *in vitro* il CLT è stato inizialmente disciolto in acqua sterile alla concentrazione di 300 mg/ml. Successivamente è stato diluito nel mezzo di coltura al fine di ottenere le concentrazioni utilizzate nel corso dei trattamenti.

5.2.2.2 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione genica delle cellule THP-1

5.2.2.2.1 Trattamento con CLT

Per valutare gli effetti del CLT sulle cellule umane abbiamo seminato 5x10⁵ cellule/ml in piastre da 24 pozzetti in un mezzo privo di antibiotici. Le cellule sono state successivamente trattate con CLT a una concentrazione finale di 100 ng/ml e incubate per tutta la notte a 37° C al 5% di CO₂. Cellule non trattate con tale neonicotinoide sono state utilizzate come controllo. Al termine del periodo di incubazione abbiamo prelevato le cellule al fine di eseguire le successive indagini molecolari.

5.2.2.2.2 Estrazione RNA e trattamento con DNasi

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando il TRIzol Reagent (Life Technologies), seguendo il protocollo descritto nel dettaglio nel paragrafo 4.2.8.1. L'RNA estratto è stato successivamente trattato con DNasi, come illustrato nel paragrafo 4.2.8.2.

5.2.2.2.3 RNA Seq

L'RNA così ottenuto è stato oggetto di un'analisi di RNA sequencing (RNA-Seq), tecnica basata sulle recenti tecnologie di Next-Generation Sequencing che permette l'analisi e la quantificazione del trascrittoma. I dati, ricavati dall'uso del "Illumina's next generation sequencing HiSeq 1000 instrument", sono stati successivamente analizzati da una Company esterna (Sequentia).

5.2.2.2.4 Predizione bioinformatica (Gene Ontology)

Una volta identificati i geni differenzialmente espressi nel gruppo sperimentale, rispetto al controllo, abbiamo valutato il loro ruolo biologico attraverso l'uso del database della "Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool". Esso è uno dei più diffusi e utilizzati strumenti bioinformatici, una sorta di dizionario e controllato vocabolario che può essere applicato a tutti gli organismi eucariotici (Ashburne *et al.*, 2000). La Gene Ontology (GO) raccoglie e classifica migliaia di termini che descrivono i geni e i loro prodotti, raggruppandoli in tre grandi categorie: funzione molecolare, processi biologici e componenti cellulari. La prima categoria raggruppa tutti i geni in base alla funzione molecolare dei loro prodotti, descrivendone l'attività cellulare. I processi biologici, invece, sono più complessi in quanto comprendono una o più funzioni molecolari. Infine, con i termini delle componenti cellulari i geni vengono raggruppati secondo la localizzazione dei loro prodotti nelle varie strutture cellulari. Nella GO i termini sono ordinati e collegati in un grafico diretto ed aciclico, dove in cima troviamo i termini più generici e procedendo verso il basso quelli più specifici. Grazie a questa struttura è possibile caratterizzare un gene, o un gruppo di geni, secondo diversi livelli di profondità. Inoltre, un gene può essere rappresentato da più di un termine per ciascuna classe poiché può essere localizzato in diversi compartimenti cellulari, avere più funzioni molecolari oppure partecipare a più processi biologici.

5.2.2.2.5 Verifica dei risultati dell'RNA-Seq

Attraverso l'analisi mediante qPCR dei campioni trattati come descritto precedentemente, abbiamo valutato l'espressione di alcuni dei geni più

interessanti, che risultavano sovra o sottoespressi dall'analisi di RNA-Seq. Per tale analisi sono state acquistate sonde Taqman. Tali sonde presentano all'estremità 5' il reporter, una molecola fluorescente, e all'estremità 3' il quencher, non fluorescente. Quando la molecola è integra il quencher assorbe l'energia emessa dal reporter, quindi non viene rilevata nessuna fluorescenza. Il saggio TaqMan sfrutta l'attività esonucleasica 5'-3' della DNA polimerasi. Nella fase di ibridazione le sonde si legano alle rispettive sequenze complementari del cDNA. Durante la fase di allungamento la polimerasi sintetizza il nuovo filamento fino ad arrivare alla sonda che si è ibridata. Per poter proseguire nella sintesi del filamento, essa rimuove i nucleotidi dalla sonda in direzione 5'-3' determinando la separazione del quencher dal reporter, che a questo punto emette fluorescenza. Poiché per ogni coppia di DNA duplicata durante la PCR vi è la liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza registrata sarà proporzionale alla quantità di DNA amplificato.

5.2.2.2.6 Retrotrascrizione

Come primo passo l'RNA è stato retrotrascritto in cDNA, cioè convertito in molecole di DNA complementari prive di sequenze introniche e sequenze regolative, mediante l'uso del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. In particolare ogni reazione è stata realizzata in un volume finale di 20 µl preparando la seguente mix (Tab. 5.1):

Reagente	Concentrazione finale
10× RT Buffer	1X
25× dNTP Mix (100 mM)	4 mM
10× Random Primers	1X
MultiScrib Reverse Transcriptase	1U
Nuclease-free H ₂ O	

Tabella 5.1 - Miscela preparata per ogni campione per realizzare la reazione di retrotrascrizione.

Ad ogni tubo è stato aggiunto 1 µg di RNA; successivamente esso è stato brevemente agitato e spinnato. La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando il MyCycler thermalcycler (BIORAD) impostato con il seguente profilo termico (Tab. 5.2) :

Temperatura (C°)	Tempo
25	10 minuti
37	120 minuti
85	5 minuti
4	∞

Tabella 5.2 - Ciclo della reazione di retrotrascrizione.

Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

5.2.2.2.7 Scelta delle sonde

Per le reazioni di qPCR riportate in questo capitolo sono state utilizzate specifiche sonde Taqman. In particolare sono state utilizzate le seguenti sonde (Tab. 5.3) (Life Technologies):

Gene name	Gene Code
IL-18BP	Hs00271720_ml
IL-17RE	Hs00979824_ml
FOXO4	Hs00936217_g1
NGFR	Hs00609976_ml
TRAF4	Hs01030624_ml
TRAF6	Hs00371512_g1
TNFα	Hs01113624_g1
GAPDH	Hs02758991_g1

Tabella 5.3 - Sonde usate nella reazione di qPCR.

5.2.2.2.8 qPCR

Le reazioni di qPCR sono state realizzate con il sistema “StepOne Real Time-PRC” a 96 pozzetti (Applied Biosystems) utilizzando il kit *TaqMan* Fast Universal PCR Master Mix (2X) (Life Technologies), seguendo il protocollo consigliato dalla casa produttrice. In particolare, in un volume finale di 10 μ l, è stata allestita per ogni campione e per ogni gene la seguente reazione (Tab. 5.4):

Reagenti	Concentrazione finale
Taq-man Master Mix (2X)	1X
Sonda TaqMan	100 nM
H ₂ O RNase DNase free	

Tabella 5.4 - Reagenti utilizzati nella reazione di qRT-PCR.

Successivamente la miscela di reazione è stata brevemente agitata, spinnata e trasferita nella piastra della real time. A ogni pozzetto sono stati aggiunti 3 μ l di cDNA, ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione descritta precedentemente, e ogni campione è stato caricato in triplicato. La piastra è stata centrifugata a 800 x g per 3 minuti a 4° C ed è stata posta nel termociclatore impostato con il seguente ciclo (Tab. 5.5):

Step	Numero cicli	Temperatura	Tempo
Hold Stage	1	95° C	5 minuti
Cycling Stage (PCR)	40	95° C	5 secondi
		60° C	20 secondi

Tabella 5.5 - Ciclo standard della qPCR.

5.2.2.2.9 Quantificazione relativa

Per quanto riguarda l'analisi dei dati, abbiamo quantificato l'espressione relativa dei geni target attraverso il metodo del $\Delta\Delta C_t$. Tale metodo si basa sul confronto tra il ciclo soglia del gene target di un campione, normalizzato sul gene endogeno, con quello di un campione preso come calibratore. Di conseguenza per prima cosa è stata calcolata la media dei cicli-soglia dei campioni analizzati in triplicato. Successivamente è stato calcolato il ΔC_t secondo la formula:

$$\Delta C_t = C_{t(\text{gene target})} - C_{t(\text{GADPH})}$$

ossia la differenza tra la media dei C_t del gene target e quella del gene endogeno.

A questo punto è stato calcolato il $\Delta\Delta C_t$ utilizzando la seguente formula:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ campione} - \Delta C_t \text{ calibratore}$$

dove ΔC_t calibratore è il valore ΔC_t del campione preso come controllo.

Infine è stato calcolato il numero di volte di espressione del gene attraverso la formula:

$$\text{Expression Fold} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

5.2.3 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione di TNF α

Per valutare gli effetti del CLT sull'espressione della citochina proinfiammatoria TNF α , abbiamo seminato 5×10^5 cellule/ml in piastre da 24 pozzetti in un mezzo privo di antibiotici. Le cellule sono state trattate per 2 ore con CLT, a una concentrazione pari 100 ng/ml, e successivamente sono state stimulate per 1 ora con 1 μ g/ml di un lipopolissaccaride batterico (LPS) (Sigma Aldrich). E' noto che l'LPS è in grado di innescare la risposta infiammatoria, inducendo il rilascio da

parte delle cellule monocitarie di citochine pro-infiammatorie attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B (Frede *et al.*, 2006). Come controllo sono state utilizzate cellule non trattate con CLT ma stimulate per 1 ora con LPS.

Abbiamo successivamente recuperato le cellule, estratto l'RNA e realizzato analisi dell'espressione del gene TNF α , attraverso qPCR, seguendo il metodo già descritto nei paragrafi precedenti.

5.2.4 Valutazione degli effetti del CLT sull'attivazione del fattore di trascrizione NK- κ B

5.2.4.1 Trasfezione delle cellule THP-1 con il reporter per NF- κ B

Per infettare le cellule THP-1 con un Lenti NF- κ B Reporter (SABiosciences) abbiamo seminato 1×10^4 cellule in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state successivamente infettate con le particelle virali ad una molteplicità di infezione pari a 10 (MOI 10). Dopo 24 ore dall'infezione le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X ed è stato aggiunto mezzo di crescita fresco. Dopo 48 ore sono stati aggiunti 50 mg/ml di puromicina per consentire la selezione dei cloni positivi.

5.2.4.2 Test della luciferasi

Le cellule THP-1 transfettate con il reporter per NF- κ B sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti, a una concentrazione di 5×10^4 cellule/pozzetto, e trattate con 100 ng/ml di CLT. Dopo 24 ore le cellule sono state stimulate con 1 mg/ml di LPS per 1 ora. Successivamente è stato eliminato il surnatante e le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X. In seguito, le THP-1 sono state lisate usando 50 μ l di Triton allo 0,1% in PBS 1X. L'attività della *Renilla* luciferasi è stata misurata al luminometro (VICTOR™ X Light Luminescence Plate Reader, PerkinElmer) utilizzando il Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), seguendo le istruzioni della casa produttrice. L'attività della luciferasi è stata normalizzata con la quantità totale di proteine che è stata misurata utilizzando il

Pierce BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) secondo le istruzioni della casa produttrice.

5.2.5 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite con l'ausilio del software IBM SPSS Statistic 21 Minitab® (v. 16; Minitab, Inc, State college, Pennsylvania) e Prism v.5 (software GraphPad, San Diego, CA, USA), impostando il livello di significatività a 0.05. La normalità dei dati è stata verificata con test di Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, a seconda del numero di campioni, mentre l'omoschedasticità è stata verificata mediante il test di Levene. L'analisi del grado di melanizzazione e dell'indice di incapsulamento è stata eseguita con il test One-Way ANOVA, usando il Games-Howel come test post-hoc. Nell'analisi di conferma dei dati di RNA-Seq, mediante qPCR, è stato utilizzato il test del *t* di student, mentre l'analisi dell'espressione del TNF α , così come l'indagine dell'attivazione di NF- κ B attraverso il test della luciferasi, è stata realizzata attraverso il test One-Way ANOVA con il test di Tukey come test post-hoc.

5.3 RISULTATI

5.3.1 Valutazione degli effetti del CLT su api adulte

Attraverso un'analisi fenotipica della risposta immunitaria di api trattate con concentrazioni crescenti di CLT, abbiamo potuto costatare come l'esposizione topica a tale neonicotinoide interferisca con i processi di melanizzazione ed incapsulamento. Tali processi restano però sempre particolarmente evidenti nel sito di contatto tra il filo di nylon e il tegumento dell'ape (Fig. 5.2).

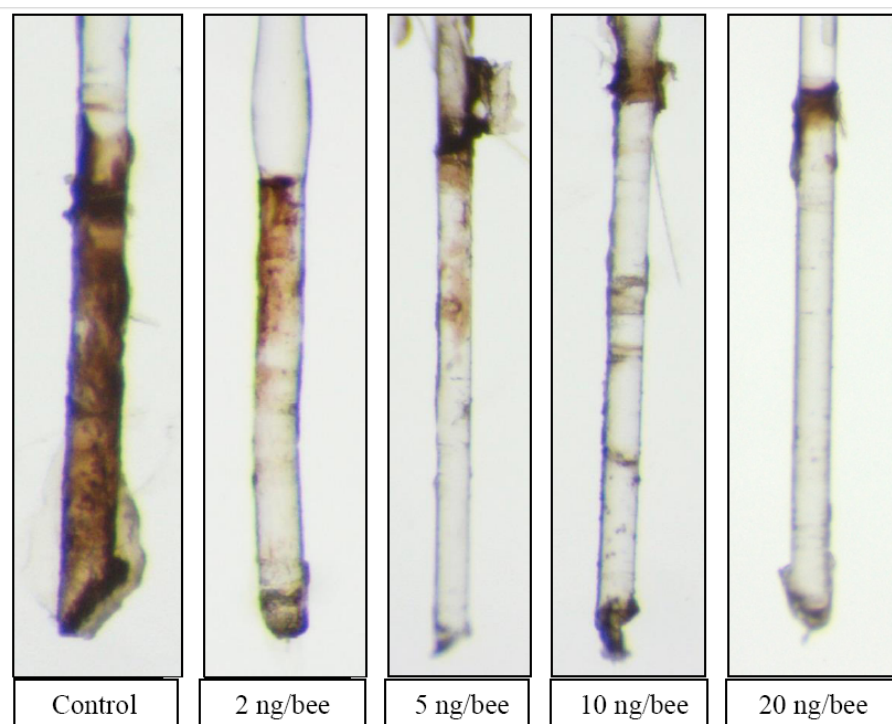


Figura 5.2 - Filo di nylon impiantato nell'addome delle api trattate con CLT. Si noti come al crescere della concentrazione di CLT si riduca la melanizzazione e l'incapsulamento.

In particolare, come si nota dai grafici riportati in Figura 5.3 (a; b), l'immunosoppressione risulta essere dose-dipendente: aumentando la concentrazione di CLT posta sul torace delle api si riduce l'indice di melanizzazione e incapsulamento. In particolare a 20 ng/ ape, che corrisponde alla DL_{50} , osserviamo una riduzione di circa il 50% di tali indici rispetto ai controlli trattati con 1 μ l di acetone.

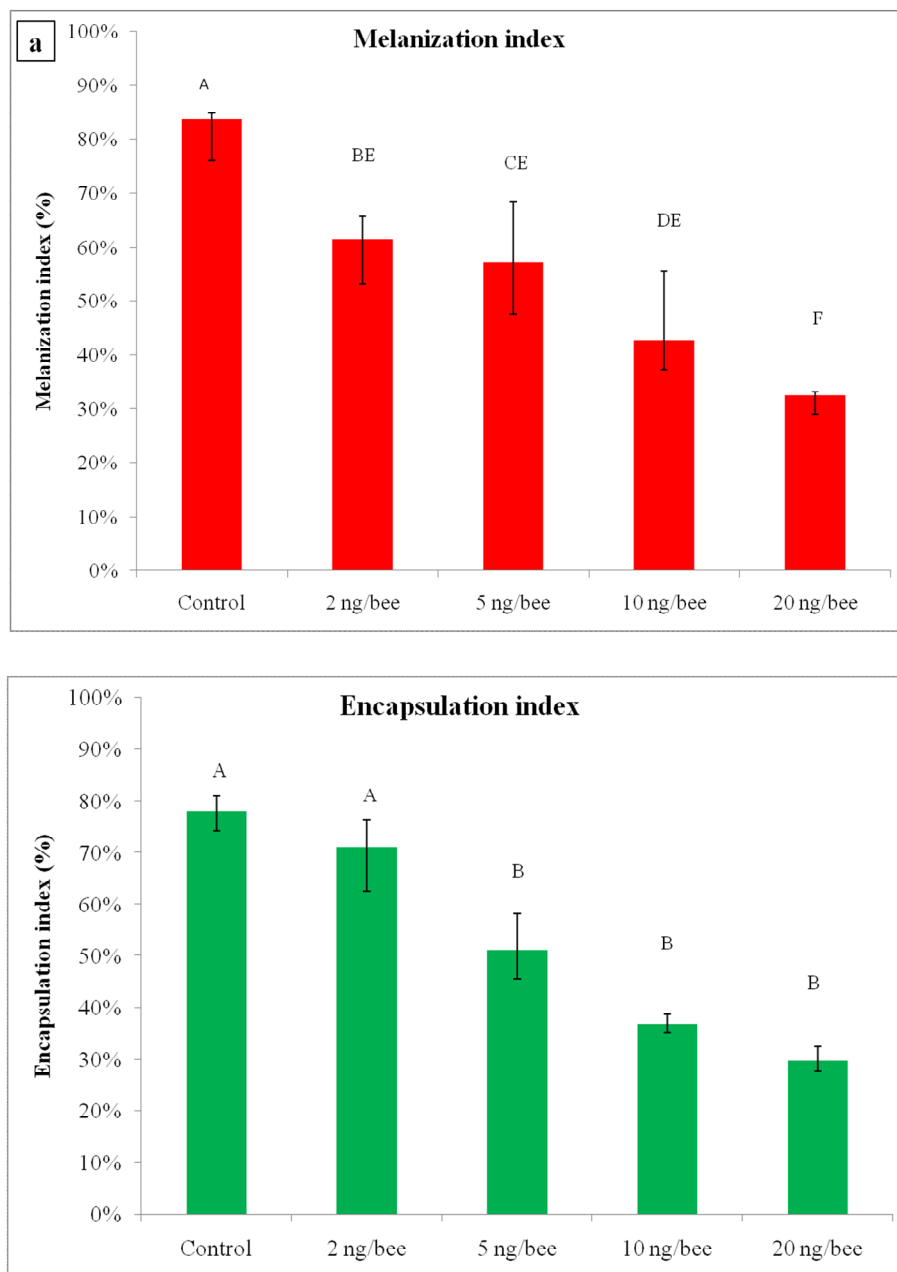


Figura 5.3 - Indice di melanizzazione e incapsulamento di api trattate con CLT. Gli istogrammi rappresentano l'indice di melanizzazione (a) ed incapsulamento (b) di api adulte esposte topicamente al CLT (One-Way ANOVA: Melanizzazione: $F=88.274$, $d=4$, $P<0.0001$; post-hoc test: Games-Howel $P<0.05$; Incapsulamento $F=134.70$, $d=4$, $P<0.0001$; post-hoc test: Games-Howel $P<0.05$)

5.3.2 Esperimenti *in vitro* su culture cellulari umane

5.3.2.1 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione genica delle cellule THP-1

Come primo passo per far luce sui possibili effetti dei neoinicotinoidi sul sistema immunitario di organismi superiori, quali i mammiferi, abbiamo valutato gli effetti del CLT sull'espressione genica delle cellule THP-1. Dall'analisi dei risultati ottenuti mediante RNA-Seq, filtrando i geni che presentavano un FDR minore di 0,05 e un logaritmo del rapporto di espressione maggiore di +1 e minore di -1, abbiamo potuto selezionare quelli che erano significativamente sovra e sottoespressi rispetto ai controlli (Tab. 5.6 a; b).

Tabella 5.6 a

Gene description	CLT_mean	THP1_mean	FDR	log ₂ FC
nerve growth factor	78,94	9,10	0,00E+000	3,12
dual specificity phosphatase 15	130,60	27,30	4,70E-014	2,26
calpain 5	456,76	110,22	0,00E+000	2,05
signal-induced proliferation-associated 1 like 2	203,84	60,02	0,00E+000	1,76
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4	145,20	48,11	2,89E-006	1,59
ependymin related 1	513,35	177,07	0,00E+000	1,54
TNF receptor-associated factor 4	509,50	184,78	0,00E+000	1,46
carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3	109,07	44,34	1,05E-012	1,30
T-box 2	303,69	126,11	0,00E+000	1,27
lysyl oxidase	205,91	85,91	2,05E-012	1,26
3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2	453,05	190,36	0,00E+000	1,25
tropomyosin 1 (alpha)	482,45	204,75	0,00E+000	1,24

family with sequence similarity 169, member A	58,32	25,89	1,17E-003	1,17
GSK3B interacting protein	200,53	89,39	3,35E-008	1,17
Rho family GTPase 1	147,43	65,92	3,73E-006	1,16
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	376,11	168,76	2,71E-013	1,16
HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	68,26	30,66	1,19E-003	1,15
coxsackie virus and adenovirus receptor	47,41	21,47	1,80E-003	1,14
protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C	1283,38	587,70	0,00E+000	1,13
protein tyrosine phosphatase, non- receptor type 3	163,31	75,20	2,76E-006	1,12
OTU domain containing 6B	357,66	169,75	5,00E-004	1,08
ALMS1 intronic transcript 1	75,26	35,84	1,07E-003	1,07
SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	290,07	138,73	3,44E-004	1,06
Protein LOC102724428; SNF1-like kinase, isoform CRA_a	59,34	28,47	1,11E-003	1,06
leucine rich repeat containing 16B	72,17	35,15	5,94E-004	1,04
KIAA1161	345,42	168,84	2,72E-004	1,03
chromosome 5 open reading frame 34	531,06	259,99	8,21E-008	1,03
glycine cleavage system protein H pseudogene 5	171,98	84,89	3,80E-004	1,02
transmembrane protein 56	113,57	56,70	4,53E-003	1,00
formiminotransferase cyclodeaminase N-terminal like	56,16	28,05	2,25E-004	1,00

Tabella 5.6 b

Gene description	CLT_mean	THP1_mean	FDR	Log₂FC
EF-hand calcium binding domain 12	12,92	44,99	0,00E+000	-1,80
lipocalin-like 1	56,22	186,43	0,00E+000	-1,73
SCO-spondin	102,06	288,00	0,00E+000	-1,50
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1	14,46	40,09	4,29E-004	-1,47
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	28,13	77,76	2,00E-015	-1,47
coiled-coil domain containing 17	25,05	68,45	7,52E-004	-1,45
fer-1-like family member 4, pseudogene (functional)	76,63	204,96	0,00E+000	-1,42
transglutaminase 5	45,90	120,79	1,63E-011	-1,40
FBXL19 antisense RNA 1 (head to head)	43,37	110,85	1,36E-004	-1,35
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3	49,04	125,15	0,00E+000	-1,35
PSMD6 antisense RNA 2	23,65	60,34	0,00E+000	-1,35
zinc finger protein 219	29,92	75,36	0,00E+000	-1,33
synaptopodin	218,88	538,18	0,00E+000	-1,30
methyltransferase like 7A	33,48	81,19	1,35E-004	-1,28

synaptonemal complex protein 2	29,22	70,02	1,17E-004	-1,26
collagen, type I, alpha 1	34,30	80,22	4,26E-004	-1,23
MSS51 mitochondrial translational activator:	48,74	113,09	0,00E+000	-1,21
adenylate cyclase 4	42,02	97,47	1,68E-004	-1,21
antizyme inhibitor 2	46,87	108,70	3,80E-005	-1,21
mitochondrial ribosome-associated GTPase 1	56,72	131,41	1,59E-012	-1,21
transmembrane protein 38A	55,37	125,26	4,39E-004	-1,18
yippee-like 3	225,81	506,41	0,00E+000	-1,17
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	40,84	91,40	1,61E-004	-1,16
tenascin XB	35,24	78,57	1,33E-004	-1,16
spire-type actin nucleation factor 2	48,27	107,53	5,26E-005	-1,16
serum/glucocorticoid regulated kinase 2	28,04	61,77	2,61E-004	-1,14
deoxyribonuclease I-like 2	27,64	60,14	3,52E-004	-1,12
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1	73,93	159,81	2,75E-004	-1,11
prolactin receptor	75,59	162,26	1,44E-004	-1,10
oxoeicosanoid (OXE) receptor 1	25,67	54,22	1,28E-003	-1,08
BRICHOS	93,35	196,03	1,62E-004	-1,07

domaincontaining 5				
dynein heavy chain domain 1	834,03	1735,93	0,00E+000	-1,06
protein tyrosine phosphatase, receptor type, O]	31,97	66,44	1,41E-004	-1,06
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	25,50	52,80	4,01E-005	-1,05
interleukin 18 binding protein	68,12	140,97	1,16E-004	-1,05
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	27,16	56,14	2,00E-004	-1,05
calcyplosine	93,23	192,48	0,00E+000	-1,05
ubiquitin associated protein 1-like	27,00	55,71	1,08E-012	-1,05
MICAL-like 2	1409,92	2904,59	0,00E+000	-1,04
collagen, type VII, alpha 1	126,98	259,90	3,90E-014	-1,03
family with sequence similarity 229, member A	152,16	308,47	0,00E+000	-1,02
progesterone and adiponectin receptor family member VIII	78,50	159,14	1,78E-004	-1,02
PDZ domain containing 7	617,39	1244,29	0,00E+000	-1,01
forkhead box O4	110,22	221,99	2,29E-004	-1,01
interleukin 17 receptor E	29,12	58,25	3,38E-004	-1,00

SH3-domain GRB2-like 1 pseudogene 1	32,61	65,05	2,80E-003	-1,00
-------------------------------------	-------	-------	-----------	-------

Tabella 5.6 - Dati ottenuti dall'analisi dell'RNA-Seq dei geni sovraespressi (a) e sottoespressi (b). Nella tabella sono riportati, per ogni gene elencato, il valore medio di espressione dei trattati con CLT (CLT mean) e dei controlli (THP-1 mean). FDR rappresenta il False Discovery Rate, ossia la frazione attesa di falsi positivi nella lista di geni differenzialmente espressi. Il Log₂FC (logaritmo del fold change) rappresenta il logaritmo del rapporto tra la media del valore di espressione del gene nei trattati rispetto ai controlli.

I trascritti differenzialmente espressi sono stati classificati in base alla loro funzione con il tool bioinformatico per l'analisi Gene Ontology GOrilla (*Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool*). Tra i geni sovraespressi è stato osservato come molti di questi interessino il sistema nervoso a livello di funzioni molecolari e componenti cellulari (Fig. 5.4).

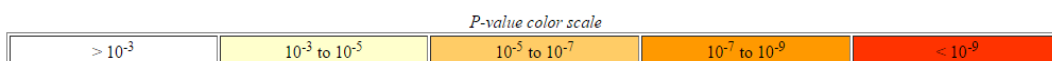
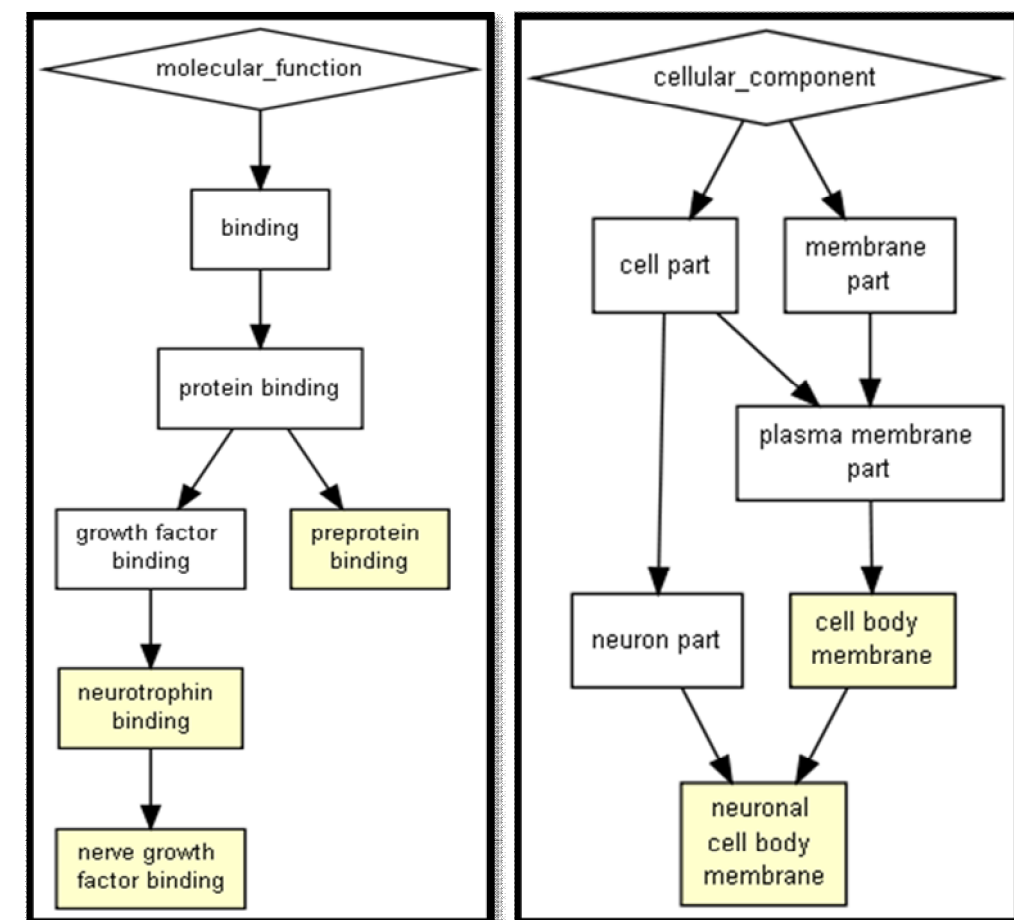


Figura 5.4 - Analisi GO. Il diagramma rappresenta le componenti cellulari e le funzioni molecolari dei geni significativamente sovraespressi in seguito al trattamento con CLT. Il numero di geni coinvolti è stato rappresentato con un codice di colori (giallo, arancio o rosso) a seconda del P-value.

Caratterizzando invece la funzione dei principali geni sottoespressi possiamo notare come questi siano principalmente coinvolti nei processi di signaling (Fig. 5.5).

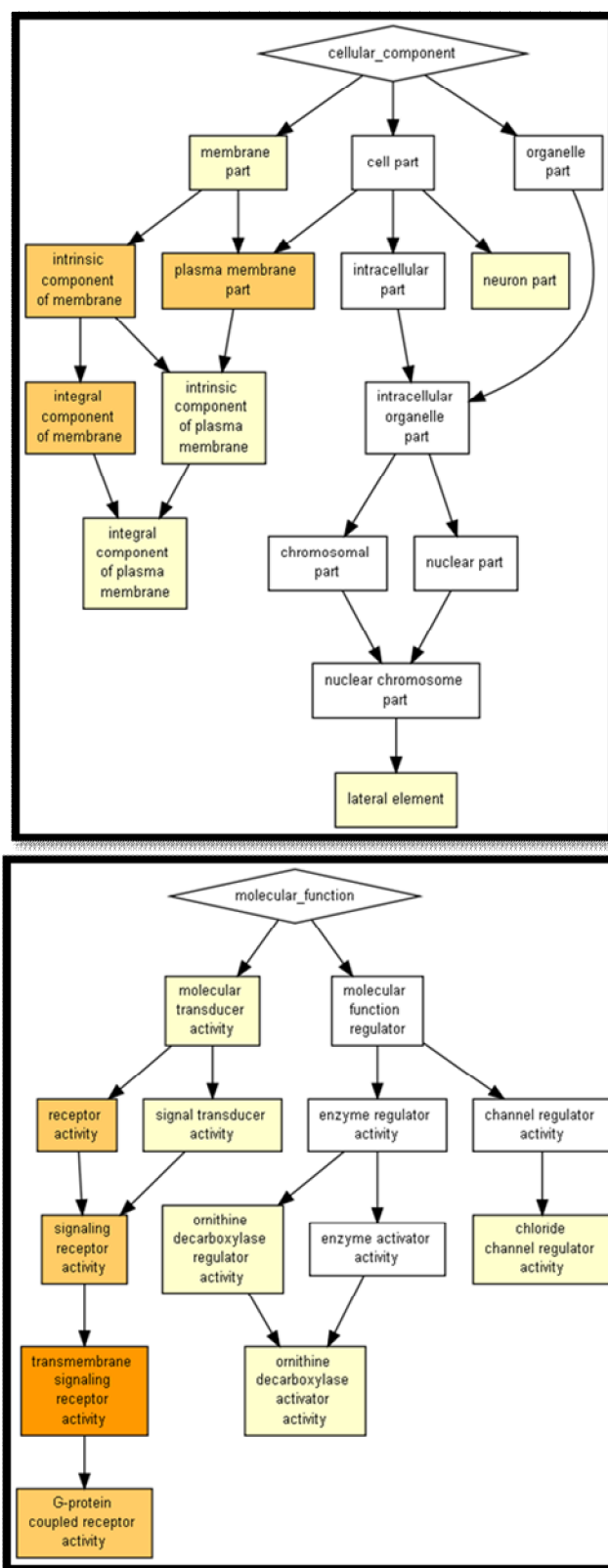


Figura 5.5 - Analisi GO. Il diagramma rappresenta le componenti cellulari e le funzioni molecolari dei geni significativamente sottoespressi in seguito al trattamento con CLT. Il numero

di geni coinvolti è stato rappresentato con un codice di colori (giallo, arancio o rosso) a seconda del P-value.

5.3.2.2 Verifica dei dati di espressione di alcuni geni selezionati

Come conferma dei dati ottenuti dall'RNA-Seq, abbiamo realizzato esperimenti di analisi quantitativa di alcuni dei più interessanti trascritti che risultavano espressi in maniera significativamente differente nei trattati con 100 ng/ml di CLT rispetto ai controlli. I nostri risultati hanno confermato una significativa sovraespressione dei geni NGFR e TRF4 (Fig. 5.6).

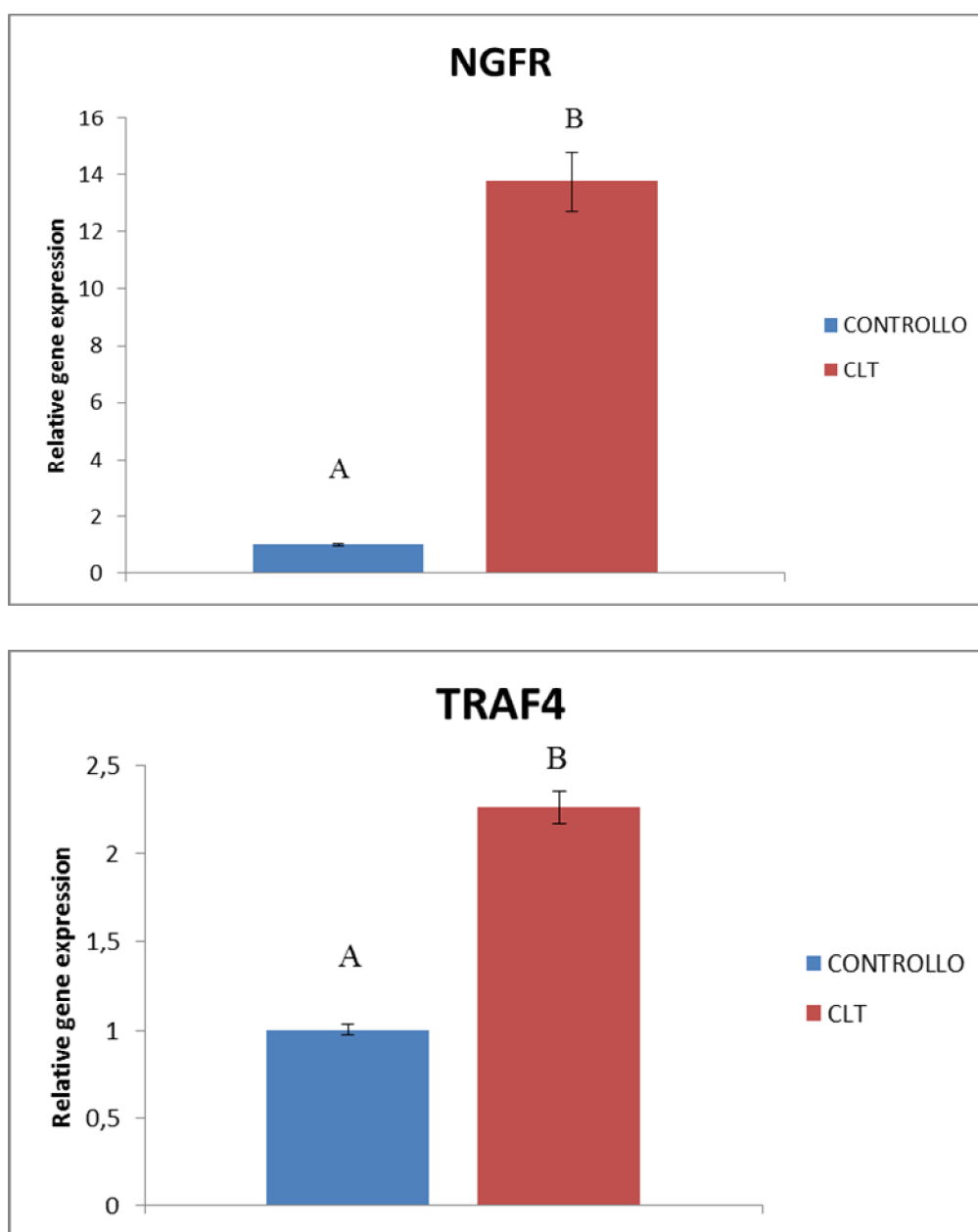
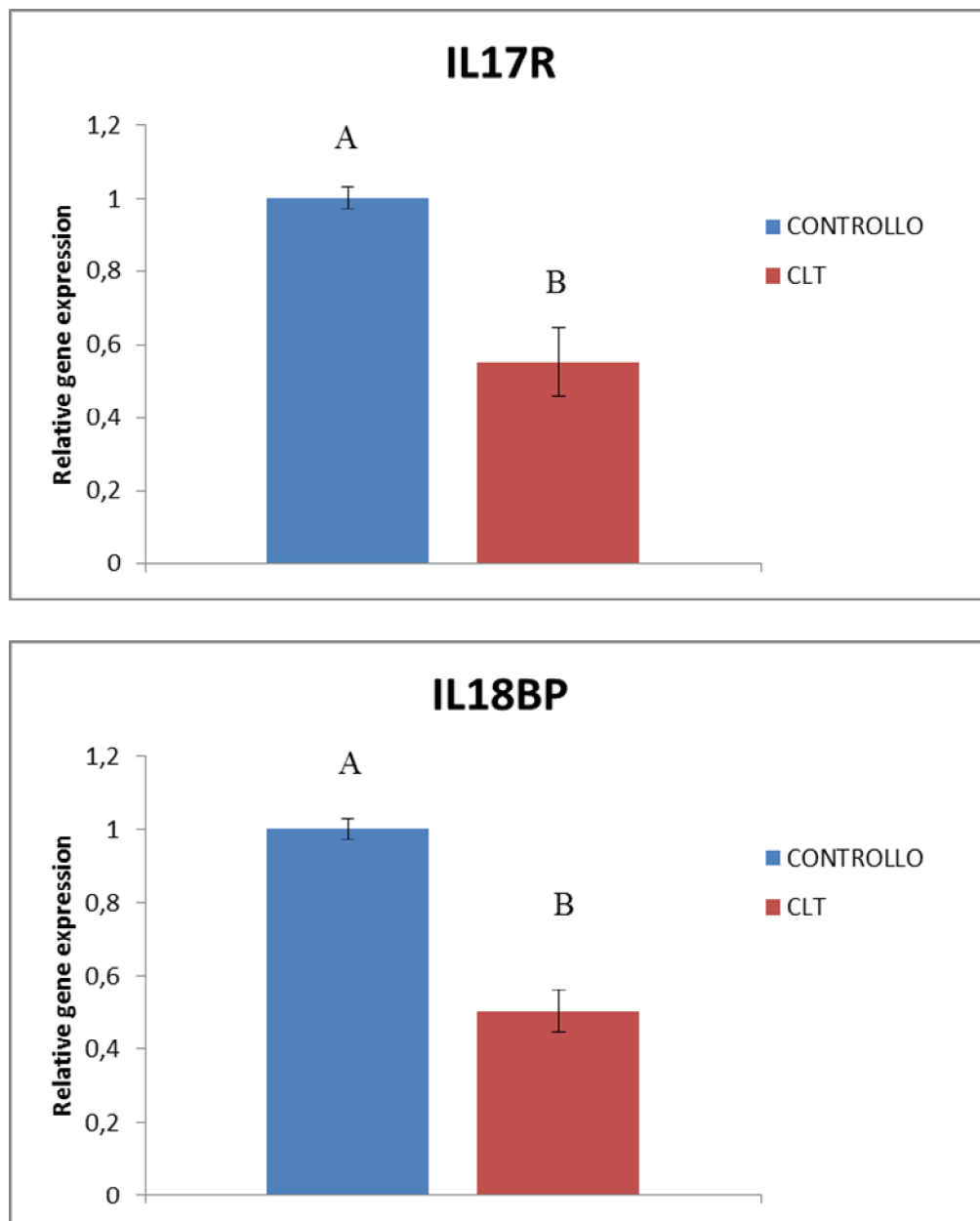


Figura 5.6 - Analisi mediante qPCR dei geni che risultavano sovraespressi nell'analisi RNA-Seq. L'analisi quantitativa conferma una significativa sovraespressione dei geni NGFR e TRF4(t student test; NGFR $t=12.28$, $df=4$, $P<0.001$; TRAF4 $t=17.06$, $df=4$, $P<0.0001$).

Allo stesso modo queste indagini hanno confermato una significativa sottoespressione dei geni IL17R, IL18BP e TRAF6 (Fig. 5.7).



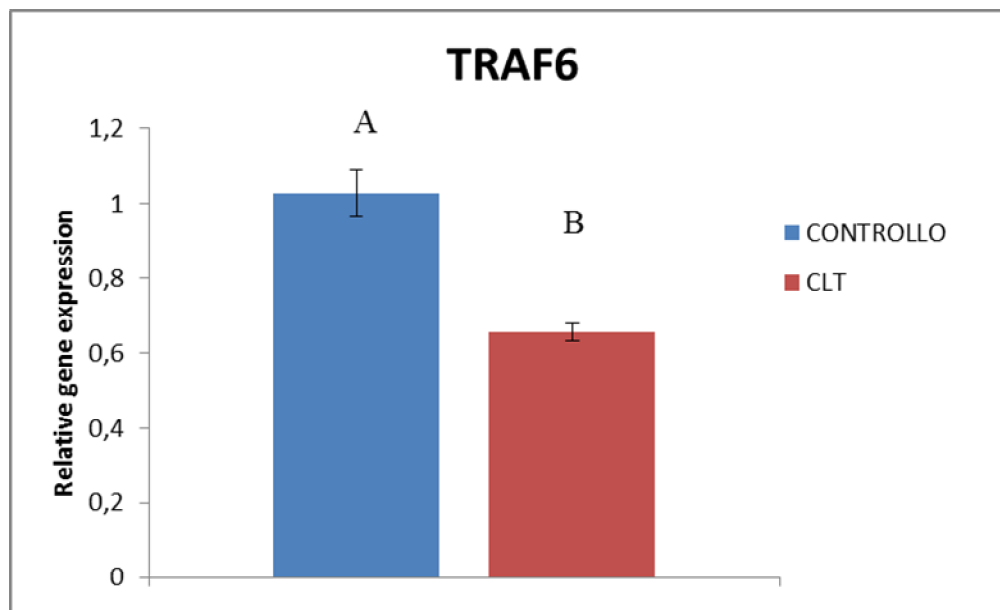


Figura 5.7 - Analisi mediante qPCR dei geni che risultavano sottoespressi nell'analisi RNA-Seq. L'analisi quantitativa conferma una significativa sottoespressione dei geni IL17R, IL18BP e TRAF6 (t student test; IL17R $t=18.976$, $df=4$, $P<0.005$; IL18BP $t=7.995$, $df=4$, $P<0.005$; TRAF6 $t=5.438$, $df=4$, $P<0.005$)

5.3.2.3 Valutazione degli effetti del CLT sull'espressione di $TNF\alpha$

Trattando le cellule con CLT per 2 ore e stimolando successivamente con LPS per 1 ora abbiamo osservato variazioni nell'espressione del gene $TNF\alpha$. In particolare, con concentrazioni di CLT pari a 100 ng/ml, abbiamo constatato una significativa riduzione nell'espressione di tale citochina proinfiammatoria rispetto ai controlli trattati solo con LPS (Fig. 5.8).

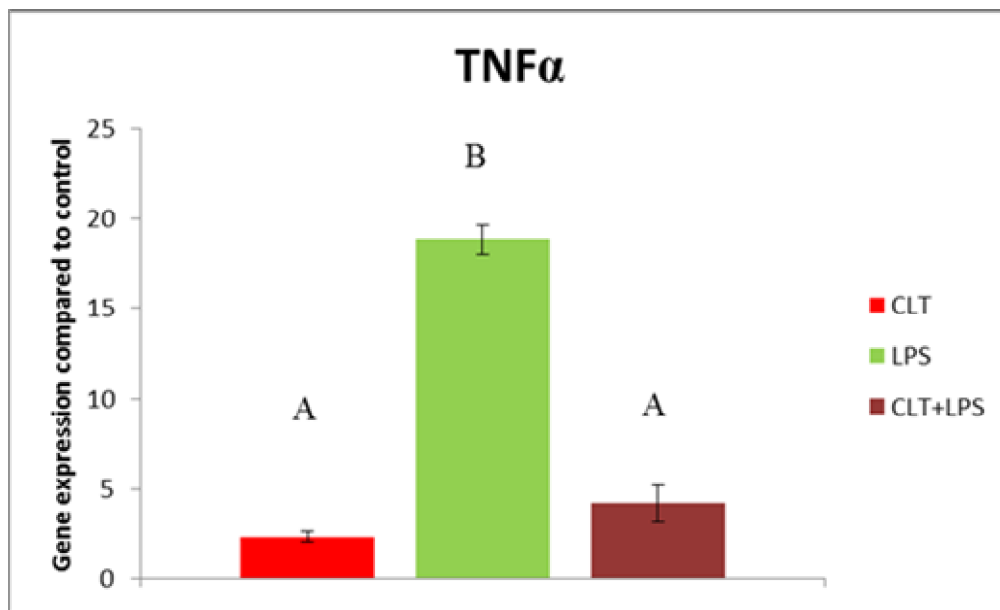


Figura 5.8 - Analisi mediante qPCR dei campioni trattati per 2 ore con CLT e 1 ora con LPS.

Alle concentrazioni di CLT usata si nota una significativa differenza nell'espressione di TNF α rispetto al controllo non trattato con tale neonicotinoide (One-Way ANOVA F=133.09, d=2, P<0.001; post-hoc test Tukey P<0.0001).

6.3.2.4 Valutazione degli effetti del CLT sull'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B

Per avere una conferma diretta dell'effetto della CLT sull'attivazione di NF- κ B, abbiamo trasfettato le cellule con un lentivirus che esprimesse un gene reporter per NF- κ B. Questo reporter presenta 5 siti di riconoscimento di NF- κ B a monte del gene della luciferasi (gene reporter), per cui l'attività enzimatica della luciferasi è direttamente proporzionale all'attività dell'NF- κ B.

La linea THP-1::NF- κ B reporter, trattata con CLT per 24h e successivamente stimolata con LPS ha mostrato un'attività della luciferasi minore a quella delle cellule controllo (Fig. 5.9). Questo risultato dimostra che il CLT interferisce con l'attività del fattore di trascrizione NF- κ B.

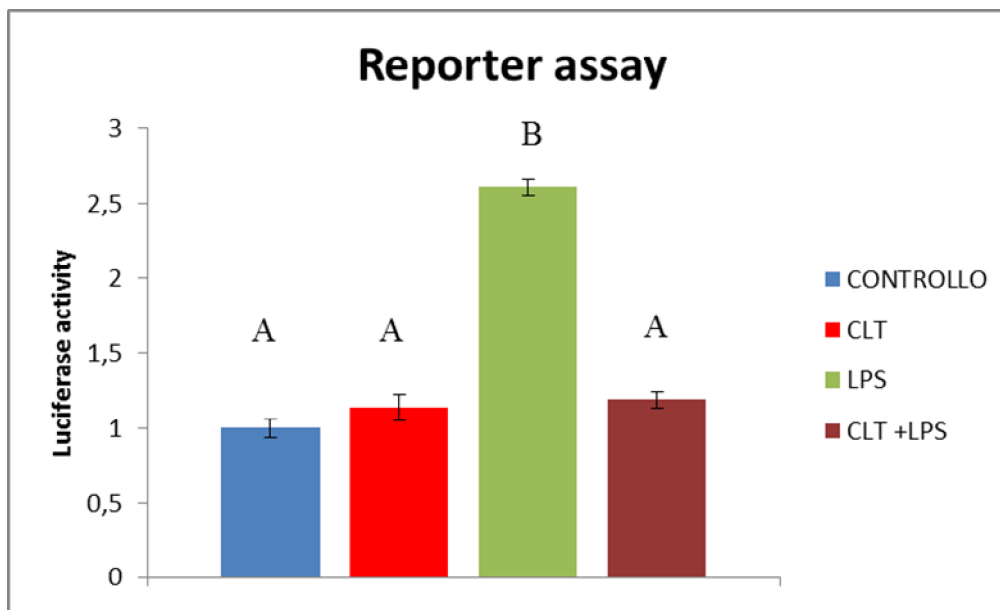


Figura 5.9 - Quantificazione della luciferasi. Il CLT in queste condizioni induce una significativa inibizione dell'attivazione di NF- κ B (One way ANOVA; $F=137.03$, $d=3$, $P<0.001$; post-hoc test Tukey $P<0.0001$).

5.3 DISCUSSIONE

I risultati presentati in questa sezione della tesi mostrano che il CLT è in grado di agire su organismi non bersaglio, quali le api e l'uomo, determinando effetti tali da poter far riflettere sulla sua potenziale azione immunotossica. Un composto immunotossico può essere definito come un composto in grado di alterare una o più funzioni immunitarie con conseguenze negative sull'organismo, come ad esempio un'immunosoppressione o un'inadeguata immunostimolazione (Corsini *et al.*, 2013). Tale condizione è stata riscontrata negli esperimenti da noi condotti su api adulte che, in seguito a somministrazione topica di CLT, hanno presentato una riduzione nei processi d'incapsulamento e melanizzazione. Un possibile link tra neonicotinoidi e immunità è stato segnalato da recenti studi che hanno dimostrato come il CLT abbia un effetto immunosoppressivo, determinando una sovrastimolazione dell'espressione di alcuni membri della famiglia delle proteine LRR, che fungono da modulatori negativi nell'attivazione di NF- κ B,

promuovendo la replicazione virale (Di Prisco *et al.*, 2013). Le proteine NF- κ B hanno un ruolo centrale in numerosi aspetti che coinvolgono la risposta immunitaria degli insetti, regolando tra l'altro la sintesi degli AMP (Schlüns e Crozier, 2007). Come dimostrato nello studio riportato nella prima sezione di questo lavoro di tesi, NF- κ B, attraverso la regolazione dell'espressione del gene Amel 102, partecipa anche ai fenomeni di melanizzazione e incapsulamento (Di Prisco *et al.*, 2016). I risultati presentati sono quindi in accordo con i dati presenti in letteratura ed evidenziano l'impatto negativo del CLT sull'immunocompetenza delle api attraverso un percorso che coinvolge l'inibizione di NF- κ B.

Dai nostri dati emerge inoltre che il CLT non solo regola negativamente la risposta immunitaria di insetti non bersaglio, quali le api, ma è in grado di influenzare anche l'espressione genica in organismi superiori. Benché i neonicotinoidi presentino una tossicità piuttosto bassa nei vertebrati, alcune indagini hanno dimostrato effetti negativi di tali insetticidi sulla crescita, sviluppo e riproduzione in alcuni mammiferi, uccelli e pesci (Gibbons *et al.*, 2015). Dall'analisi mediante GO dei geni sovra e sottoespressi è emerso come il trattamento con CLT determini un'alterazione nei processi di signaling, influenzando in particolar modo gli elementi coinvolti nella trasmissione neuronale, il che lascia supporre un possibile effetto neurotossico. A supporto di tale ipotesi bisogna tener presente che negli insetti i neonicotinoidi fungono da neurotossine, legandosi irreversibilmente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina (Tomizawa e Casida, 2003). Benché presentino una minore affinità per i recettori dei mammiferi, recenti studi condotti su topi e ratti hanno evidenziato un impatto negativo di tali sostanze sul sistema neuronale di questi, con alterazioni biochimiche, danni sulla memoria e sulla capacità di apprendimento ed effetti sul comportamento (Ozdemir *et al.*, 2014).

Dalle prove condotte su una linea monocitaria umana è inoltre emerso un'alterazione nell'espressione di geni coinvolti, direttamente o indirettamente, nella risposta immunitaria. Abbiamo ad esempio registrato alterazioni a carico dell'espressione di "fattori associati ai recettori di TNF" (TRAF), una famiglia di proteine intracellulari fondamentali nei processi di sviluppo e nelle funzioni immunitarie (Aggarwal *et al.*, 2009). Più nel dettaglio abbiamo registrato una regolazione negativa dell'espressione del gene che codifica per il recettore

dell'interleuchina 17 (IL17R) e di TRAF 6, coinvolti nei meccanismi di difesa dei mammiferi. La famiglia delle IL17 svolge un fondamentale ruolo nei meccanismi di difesa, inducendo la sintesi di chemochine, citochine infiammatorie e peptidi antimicrobici. La segnalazione indotta da tale citochina si realizza attraverso l'attivazione di un recettore eteromero (IL17R) che interagisce con una proteina adattatrice che catalizza la poliubiquitinazione di TRAF6 e l'attivazione di NF- κ B. TRAF6 è quindi di fondamentale importanza per la segnalazione dipendente da IL17 e media l'attivazione di NF- κ B; è stato inoltre osservato che una sovraespressione di TRAF 6 attiva NF- κ B (Ishida *et al.*, 1996). TRAF6 partecipa inoltre nella via di segnalazione attivata da IL18. Tale citochina, che per funzionare deve legare la proteina solubile IL18-BP, induce l'attivazione della via di segnalazione che coinvolge NF- κ B (Dinarello e Fantuzzi, 2003). Tale via di segnalazione risulta alterata come conferma la sottoespressione di IL18-BP. Interessante è stato anche verificare un effetto positivo sull'espressione di TRAF4, proteina che funge da regolatore negativo della segnalazione dipendente da IL17R (Xie, 2013) e da bersaglio della chinasi IKK α che, in seguito a fosforilazione di tale fattore, attiva NF- κ B (Marinis *et al.*, 2012). Studi *in vitro* hanno dimostrato che nel corso della sua attivazione TRAF 4 lega la subunità p75 del recettore del fattore di crescita neuronale (p75-NGFR) (Krajewska *et al.*, 1998). Questo risulta in linea con i nostri risultati, che mostrano una concomitante sovraespressione di TRAF4 e NGFR.

Questi dati suggeriscono che il CLT possa avere un'azione, diretta o indiretta, sull'attivazione di NF- κ B, con effetti su questo fattore di trascrizione simili a quelli evidenziati nelle api (Di Prisco *et al.*, 2013). Tale ipotesi è stata ulteriormente confermata dalle prove realizzate con l'uso dell'LPS, endotossina in grado di indurre una risposta infiammatoria, con attivazione di NF- κ B e conseguente induzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie, quali TNF α (Kim *et al.*, 2007). Dai nostri dati è emerso che il trattamento con CLT è in grado di inibire la risposta infiammatoria, con conseguenze negative sull'espressione di TNF α e sull'attivazione di NF- κ B.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano un effetto immunosoppressivo sulle api e sulle cellule umane, anche se in quest'ultimo caso i dati non sono sufficienti per trarre conclusioni definitive sul rischio immunotossico associato

all'esposizione ai neonicotinoidi. Sono quindi necessari ulteriori studi *in vitro* e *in vivo* che ci permettano di definire al meglio le possibili conseguenze legate all'esposizioni a tali sostanze che, visto l'intensivo uso e l'elevata persistenza sulle colture, rappresenta una questione non più rimandabile.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi fornisce un contributo allo studio dei meccanismi sottesi all'impatto di diversi fattori di stress sulla competenza immunitaria delle api e sulle loro condizioni di salute.

Nella prima parte del lavoro abbiamo analizzato i meccanismi messi in gioco dal DWV per sopprimere la risposta immunitaria favorendo non solo la proliferazione del virus ma anche la fitness della *Varroa* che funge da vettore del virus stesso.

Nella seconda parte della tesi abbiamo dimostrato come diete sbilanciate e ricche di amminoacidi abbiano effetti negativi sullo stato di benessere delle api e sulla capacità di queste di far fronte a ulteriori fattori di stress.

Infine, abbiamo riportato prove dell'effetto negativo dei neonicotinoidi (clothianidin) sulla risposta immunitaria delle api e risultati preliminari che mostrano il possibile effetto immunosoppressivo indotto da questo neonicotinoide sui mammiferi.

I risultati presentati in questo lavoro forniscono un contributo alla comprensione dell'intricata rete di interazioni fisiologiche che regolano la risposta immunitaria delle api, rendendo realizzabile, in prospettiva, l'analisi di possibili sinergie fra diversi fattori di stress.

Ciò pone le basi per ulteriori studi finalizzati a chiarire (i) quali meccanismi molecolari regolano l'azione combinata e potenziata di più fattori di stress, (ii) quali vie metaboliche partecipano alla modulazione della risposta immunitaria e le possibilità di una loro manipolazione per potenziare le difese delle api, (iii) gli effetti che i neonicotinoidi hanno a livello di organismo sugli animali superiori.

Questi studi consentiranno non solo di comprendere alcuni aspetti di base della regolazione multifattoriale della competenza immunitaria negli insetti, ma forniranno una serie di informazioni utili allo sviluppo di nuove strategie di protezione delle api e di altri impollinatori.

BIBLIOGRAFIA

Abou-Donia M.B., Goldstein L.B., Bulman S., Tu T. , Khan W.A., Dechkovskaia A.M. and Abdel-Rahman A.A. (2008). "Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure". *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 71:119–130.

Agaisse H and Perrimon N. (2004). "The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses". *Immunological reviews*, 198:72–82.

Agaisse H., Petersen U.M., Boutros M., Mathey-Prevot B. and Perrimon N. (2003). "Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury". *Developmental cell*, 5:441–50.

Aggarwal K. and Silverman N. (2008). "Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response". *BMB Reports*, 41: 267-277.

Aggarwal B.B., Bharti A.C. and Shishodia S. (2009). "Tumor Necrosis Factor and Its Family Members". In *Protein Discovery Technologies* (Eds. Arap W., Pasqualini R. and Salvesen G.), pp 15-54.

Aizen M.A. and Harder L.D. (2009). "The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination". *Current Biology*, 19: 915-918.

Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity". *Cell*, 124: 783–801.

Alaux C., Dantec C., Parrinello H. and Le Conte Y. (2011). "Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *Varroa*-parasitized bees". *BMC Genomics*, 12: 496.

Alaux C., Ducloz F., Crauser D. and Le Conte Y. (2010). "Diet effects on honeybee immunocompetence". *Biology Letters*, DOI:10.1098/rsbl.2009.0986.

Allen M.F. and Ball B.V. (1995). "Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir Bee Virus". *Annals of Applied Biology*, 126: 471-484.

Allen M.F., Ball B.V. and Underwood B.A. (1990). “An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*”. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 439–440.

Amar S., Zhou Q., Shaik-Dasthagirisahab Y. and Leeman S. (2007). “Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 104: 20466–20471.

Amdam G.V., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A. and Omholt S.W. (2004). “Altered physiology in worker honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*): a factor in colony loss during overwintering?” *Journal of Economic Entomology*, 97 (3): 741–747.

Andersen S.O., Hojrup P. and Roepstorff P. (1994). “Insect Cuticular Proteins”. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2): 153–176.

Anderson D.L. and Gibbs A. J. (1988). “Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia”. *Journal of General Virology*, 69:1617–1625.

Anderson D.L. and Trueman J.W.H (2000). “*Varroa jacobsoni* (Acari: *Varroidae*) is more than one species”. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165–189.

Arechavaleta-Velasco M.E. and Guzman-Novoa E. (2001). “Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies”. *Apidologie*, 32:157–174.

Arnot C.J., Gay N.J. and Gangloff M. (2010). “Molecular mechanism that induces activation of Spatzle, the ligand for the *Drosophila* Toll receptor”. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 19502–19509.

Aronstein K. and Salvidar E. (2005). “Characterization of a honey bee Toll related receptor gene *Am18w* and its potential involvement in antimicrobial immune defense”. *Apidologie*, 36: 3–14.

Aronstein K., Vega S.E., Westmiller R. and Douglas S.A.E. (2012). “How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*”. *Insects*, 3:601-615.

Ashburner M.M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G. M. and Sherlock G. (2000). “Gene Ontology: tool for the unification of biology”. *Nature Genetics*, 25: 25 – 29.

Ashiralieva A. and Genersch E. (2006). “Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees”. A review. *Apidologie* 37: 411–420.

Aubert M., Ball B., Fries I., Moritz R., Milani N. and Bernardinelli I. (2008). “Virology and the Honey Bee”. European Commission.

Baer B. and Schmid-Hempel P. (2006). “Phenotypic variation in male and worker encapsulation response in the bumblebee *Bombus terrestris*”. *Ecological Entomology*, 31: 591–596.

Bailey L. and Ball B.V. (1991). “Honey bee pathology”. Academic Press: vii, 193p.

Baker A. and Schroeder D. (2008). "Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England". *Journal of invertebrate pathology*, 98: 239-242.

Ball B.V. (1989). “*Varroa jacobsoni* as a virus vector”. In: Cavalloro, R. (Ed), “Present status of varroatosis in Europe and progress in the *Varroa* mite control”. Udine, Italy, pp.241-244.

Ball B.V. and Allen M.F. (1988). “The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*”. *Annals of applied biology*, 113: 237-244.

Ball B.V. and Bailey L. (1997). “Honey Bee Pest, Predators, and Diseases”. *Viruses* pp. 11–31. The A. I. Root Co., Medina, OH. (R. A. Morse and K. Flottum, eds.).

Bailey L. and Fernando E.F.W. (1972). "Effects of *Sacbrood virus* on adult honey bees". *Annals of Applied Biology*, 72:27–35.

Bailey L. and Woods R.D. (1977). "Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses". *Journal of General Virology*, 37:175–182.

Bailey L., Carpenter J. M. and Woods R. D. (1979). "Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus". *Journal of General Virology*, 43:641–647.

Bailey L., Gibbs A. J. and Woods R. D. (1963). "Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera Linnaeus*)". *Virology*, 21:390–395.

Bailey L., Woods R. D. and Gibbs A. J. (1963). "2 viruses from adult honey bees (*Apis mellifera Linnaeus*)". *Virology*, 21: 390.

Baracchi D., Fadda A. and Turillazzi S. (2012). "Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies". *Journal of Insect Physiology*, 58:1589–1596.

Berenbaum M.R. and Johnson R.M. (2015). "Xenobiotic detoxification pathways in honey bees". *Current Opinion in Insect Science*, 10: 51–58.

Beutler B. (2004). "Innate immunity: an overview". *Molecular immunology*, 40: 845–859.

Bíliková K., Gusui W. and Simuth J. (2001). "Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor". *Apidologie*, 32: 275–283.

Bilikova K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klaudiny J. and Simuth J. (2002). "Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera L.*) royal jelly: purification and molecular characterization". *FEBS letters*, 528: 125-129.

Blacquièrè T., Smagghe G., van Gestel C. A. M. and Mommaertset V. (2012). "Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment". *Ecotoxicology (London, England)*, 21(4): 973–92.

Blomquist G.J. and Bagnères A.G. (2010). “Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology”. University Press, Cambridge.

Blomquist G.J. and Dillwith J.W. (1985). “Cuticular lipids”. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Integument, Respiration and Circulation*, vol. 3. Pergamon, Oxford, pp. 117e154.

Boecking O. and Genersch E. (2008). “Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 3: 221–228.

Boecking O. and Spivak M. (1999). “Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud”. *Apidologie*, 30:141–158.

Boman HG. (1991). “Antibacterial peptides: key components needed in immunity”. *Cell*, 65: 295-207.

Boutros M., Agaisse H. and Perrimon N. (2002). “Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*”. *Developmental cell*, 3: 711–722.

Bowen-Walker P.L., Martin S.J. and Gunn A. (1999). “The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud”. *Journal of invertebrate pathology*, 73: 101–106.

Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., François M. and Ashida M. (1993). “Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 6275-6279.

Brodschneider R. and Cailsheim K. (2010). “Nutrition and health in honey bees”. *Apidologie* 41: 278–294.

Brown L.A., Ihara M., Buckingham S.D., Matsuda K. and Sattelle D.B. (2006). “Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors”. *Journal of Neurochemistry*, 99: 608–615.

Brutscher L.M. and Flenniken M.L. (2015). "RNAi and Antiviral Defense in the Honey Bee". *Journal of Immunology Research*, Article ID 941897, 10 pages.

Buchwald R. and Breed M.D. (2005) "Nestmate recognition cues in a stingless bee, *Trigona fulviventr*is". *Animal Behaviour*, 70:1331–1337.

Buckner J.S., Pitts-singer T.L., Guedot C., Hagen M.M., Fatland C.L., Kemp W.P. (2009). "Cuticular lipids of female solitary bees, *Osmia lignaria* Say and *Megachile rotundata* (F.) (Hymenoptera: *Megachilidae*)". *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 153:200–205.

Calderone N. W. (2012). "Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009". *PLoS ONE*, 7(5): e37235.

Calderone N.W. and Kuenen L.P.S. (2003). "Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping". *Apidologie*, 34(6): 543–552.

Calderone N.W. and Lin S. (2001). "Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*)". *Physiological Entomology*, 26(4): 341–350.

Carvalho L.G., Kunin W.G., Keil P., Aguirre-Gutierrez J., Ellis W.E., Fox R., Groom Q., Hennekens S., Van Landuyt W., Maes D., Van de Meutter F., Michez D., Rasmont P., Ode B., Potts S.G., Reemer M., Roberts S.P.M., Schaminée J., WallisDeVries M.F. and Biesmeijer J.C. (2013). "Species Richness Declines and Biotic Homogenisation have Slowed Down for NW-European Pollinators and Plants". *Ecology Letters*, 16: 870–878.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F. and Tempst P. (1993). "Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*)". *The Journal of biological chemistry*, 268(10): 7044-7054.

Casteels P., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F. and Tempst P. (1990). "Isolation and characterization of abaecin, a

major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*)". European journal of biochemistry/ FEBS, 187 (2): 381-386.

Cerenius L., Lee B.L. and Soderhall K. (2008). "The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity". Trends in immunology, 29:263-71.

Chanput W., Mes J.J. and Wichers H.J. (2014). "THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for: immune modulation approach". International Immunopharmacology, 23: 37-45.

Chantawannakul P., Ward L., Boonham N. and Brown M. (2006). "A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary". Journal of Invertebrate Pathology, 91:69-73.

Chauzat M.P., Faucon J.P., Martel A.C., Lachaize J., Cougoule N. and Aubert M. (2006). "A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France". Journal of Economic Entomology, 99: 253-262.

Chauzat M.P., Martel A.C., Cougoule N., Porta P., Lachaize J., Zeggane S., Aubert M., Carpentier P. and Faucon J.P. (2011). "An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (*Hymenoptera Apidae*) to monitor pesticide presences in continental France". Environmental Toxicology and Chemistry, 30:103-111.

Chen Y.P. and Siede R. (2007). "Honey bee viruses". Advances in virus research, 70: 33-80.

Chen Y.P., Evans J.D. and Feldlaufer M.F. (2006a). "Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*". Journal of invertebrate pathology, 92(3):152-159.

Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen-Rindal D. and Pettis J.S. (2009). "Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*". The Journal of eukaryotic microbiology, 56: 142-147.

Chen Y.P., Higgins J.A. and Feldlaufer M.F. (2005). "Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.)". *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 436–441.

Chen Y.P., Pettis J.S., Collins A. and Feldlaufer M.F. (2006). "Prevalence and transmission of honeybee viruses". *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 606-611.

Chen Y.P., Zhao Y., Hammond J., Hsu H.T., Evans J.D. and Feldlaufer M. (2004). "Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses". *Journal of invertebrate pathology*, 87:84-93.

Choe K.M., Lee H. and Anderson K.V. (2005). "*Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 1122–1126.

Christensen B.M., Li J., Chen C.C. and Nappi A.J. (2005). "Melanization immune responses in mosquito vectors". *Trends in parasitology*, 21: 192-9.

Corsini E., Sokooti M., Galli C. L., Moretto A. and Colosio C. (2013). "Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence". *Toxicology*, 307: 123–135.

Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., van Engelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S. and Lipkin W.I. (2007). "A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder". *Science*, 318: 283–287.

Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L. and Neumann P. (2012). "Dead or alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees". *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 981–987.

- De Guzman L.I. and Delfinado-Baker M.** (1996). “A new species of *Varroa* (Acari: *Varroidae*) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: *Hymenoptera*) in Borneo”. *International Journal of Acarology*, 22: 23–27.
- De Jong D., De Jong P.H. and Gonçalves L.S.** (1982). “Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*”. *Journal of Apicultural Research*, 21: 165–216.
- de Miranda J.R. and Genersch E.** (2010). “Deformed wing virus”. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S48-S61.
- De Ruijter A. and Kaas J.P.** (1983). “The anatomy of the *Varroa* mite”. In: Cavalloro, R. (Ed.): *Varroa jacobsoni* Oud Affecting Honey Bees: Present Status and Needs. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 45–47.
- Decourtye A. and Devillers J.** (2010). “Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees”. In: Thany S. (Ed.), *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Landes Bioscience.
- Decourtye A., Armengaud C., Renou M., Devillers J., Cluzeau S., Gauthier M. and Pham-Delegue M.H.** (2004). “Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.)”. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78: 83–92.
- DeGrandi-Hoffman G. and Chen Y.** (2015). “Nutrition, immunity and viral infections in honey bees”. *Current Opinion in Insect Science*, 10: 170–176.
- DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E. and Huang M.H.** (2010). “The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.)”. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1184-1191.
- Del Piccolo F., Nazzi, F., Della Vedova G. and Milani N.** (2010). “Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons”. *Parasitology*, 137: 967–973.
- Delfinado-Baker M. and Aggarwal K.** (1987). “A new *Varroa* (Acari: *Varroidae*) from the nest of *Apis cerana* (Apidae)”. *International Journal of Acarology*, 13: 233–237.

Desai S.D., Eu Y.J., Whyard S. and Currie R.W. (2012). “Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion”. *Insect Molecular Biology*, 21: 446-455.

Desneux N., Decourtye A. and Delpuech J. (2007). “The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods”. *Annual Review of Entomology*, 52: 81-106.

Di Lelio I., Varricchio P., Di Prisco G., Marinelli A., Lasco V., Caccia S., Casartelli M., Giordana B., Rao R., Gigliotti S. and Pennacchio F. (2014). “Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi”. *Journal of insect physiology*, 64: 90-97.

Di Prisco G., Annoscia D., Margiotta M., Ferrara R., Varricchio P., Zanni V., Caprio E., Nazzi F. and Pennacchio F. (2016). “A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113(12): 3203–3208.

Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G. and Pennacchio F. (2013). “Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(46): 18466-18471.

Di Prisco G., Zhang X., Pennacchio F., Caprio E., Li J., Evans J.D., DeGrandi-Hoffman G., Hamilton M. and Ping Chen Y. (2011). “Dynamics of Persistent and Acute Deformed Wing Virus Infections in Honey Bees, *Apis mellifera*”. *Viruses*, 3(12): 2425-2441.

DiAngelo J.R., Blanda M.L., Bambina S., Cherry S. and Birnbauma M.J. (2009). “The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling”. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 106: 20853–20858.

Dinareello C.A. and Fantuzzi G. (2003). “Interleukin-18 and Host Defense against Infection”. *Journal of Infectious Diseases*, 187 (2):S370–S384.

Doner L.W. (1977). “The sugars of honey - a review”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 443–456.

Donzé G. and Guerin P. M. (1994). "Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood". Behavioral Ecology and Sociobiology, 34: 305-319.

Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Hoffmann J.A. and Imler J.L. (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila". Nature immunology, 6 (9): 946-953.

Duay P., de Jong D. and Engels W. (2002). "Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development". Genetics and Molecular Research, 1: 227–232.

Duay P., de Jong D. and Engels W. (2003). "Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites". Apidologie, 34: 61–65.

Dushay M. (2009). "Insect hemolymph clotting.Review". Cellular and Molecular Life Sciences, 66: 2643-2650.

Ellis A.M. and Hayes G.W. Jr (2009). "An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*)". Journal of apicultural research, 48: 215–216.

Ellis J.D., Evans J.D. and Pettis J. (2010). "Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States". Journal of apicultural research, 49(1): 134–136.

Environmental Protection Agency (EPA), Office of Pesticide Programs (2003). "Factsheet Clothianidin". EPA Publication 7501C; www.epa.gov/opprd001/factsheets/clothianidin.pdf.

European Academies' Science Advisory Council (EASAC). (2015). "Ecosystem services, agriculture and neonicotinoids".

Erturk-Hasdemir D., Broemer M., Leulier F., Lane W.S., Paquette N., Hwang D., Kim C.H., Stoven S., Meier P. and Silverman N. (2009). "Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the

induction of antimicrobial peptide genes”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 9779–9784.

Evans J. D. (2001). “Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses”. Journal of Invertebrate Pathology, 78:189-193.

Evans J.D. and Schwarz R.S. (2011). "Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health". Trends in microbiology, 19: 614-620.

Evans J.D. and Spivak M. (2010). “Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees”. Journal of Invertebrate Pathology, 103: S62–S72.

Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z. and Hultmark D. (2006). “Immune pathways and defence mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*”. Insect Molecular Biology, 15:645–656.

Eyer M., Chen Y.P., Schäfer M.O., Pettis J. and Neumann P. (2009). “Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honey bee viruses”. Apidologie, 40: 419–428.

Fairbrother A., Purdy J., Anderson T. and Fellk R. (2014). “Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees”. Environmental Toxicology and Chemistry, 33 (4): 719–731.

Falabella P., Riviello L., Pascale M., Di Lelio I., Tettamanti G., Grimaldi A., Iannone C., Monti M., Pucci P., Tamburro A.M., deEguileor M., Gigliotti S. and Pennacchio F. (2012). “Functional amyloids in insect immune response”. Insect biochemistry and molecular biology, 42(3): 203-211.

FAO (2009). FAOSTAT/Production/ Live Animals.<http://faostat.fao.org>.

Farooqui T. (2012). “A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis”. Neurochemistry international, 62:122-136.

Fehlbaum P., Bulet P., Michaut L., Lagueux M., Broekaert W..F, Hetru C. and Hoffmann J.A. (1994). “Septic injury of *Drosophila* induced the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. The Journal of Biological Chemistry, 269: 33159-33163.

Fernández N., Eguaras M. and Hernández D. (1993). “Distribution patterns of *Varroa jacobsoni* Oud. on *Apis mellifera* L during winter in Argentina”. Apidologie, 24: 397–401.

Fievet J., Tentcheva D., Gauthier L., de Miranda J., Cousserans F., Colin M.E. and Bergoin M. (2006). “Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L”. Virology Journal, 3:16.

Flemming G. (1871). “Animal plagues, Their history, nature and prevention”. Chapman and Hall.

Forsgren E. (2010).”European foulbrood in honey bees”. Journal of Invertebrate Pathology, 103: S5–S9.

Forsgren E., de Miranda J.R., Isaksson M., Wei S. and Fries I. (2009). “Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*)”. Experimental and Applied Acarology, 47: 87–97.

Franca T.G.D., Ishikawa L.L.W., Zorzella-Pezavento S.F.G., Chiuso-Minicucci F., daCunha M.L.R.S. and Sartori A. (2009). “Impact of malnutrition on immunity and infection”. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 15: 374-390.

Frede S., Stockmann C., Freitag P. and Fandrey J. (2006). “Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kB”. Biochemical Journal, 396(3): 517-527.

Freitak D., Ots I., Vanatoa A. and Horak P. (2003). “Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae”. Proceedings of the Royal Society of London B, 270: S220–S222.

Gahring L.C. and Rogers S.W. (2006). “Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells”. The AAPS journal, 7(4): 885–894.

Gallai N., Salles J.M., Settele J. and Vaissière B.E. (2009). “Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline”. Ecological economics 68: 810–821.

Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Böhler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G. and Rosenkranz P. (2010). “The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies”. Apidologie, 41: 332–352.

Genersch E., Yue C., Fries I. and de Miranda J. R. (2006). “Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities”. Journal of Invertebrate Pathology, 91(1): 61–63.

Gibbons D., Morrissey C. and Mineau P. (2014). “A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife”. Environmental Science and Pollution Research, 22: 103–118.

Gill R.J., Ramos-Rodriguez O. and Raine N.E. (2012). “Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees”. Nature, 491(7422): 105–108.

Gillespie J.P., Kanost M.R. and Trenczek T. (1997). “Biological mediators of insect immunity”. Annual Review Entomology, 42: 611–643.

Girardin S.E. and Philpott D.J. (2004). “The role of peptidoglycan recognition in innate immunity”. European journal of immunology, 34: 1777–1782.

Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T. and de Guzman L. (2005). “Conditional Immune-Gene Suppression of Honeybees Parasitized by *Varroa mites*.” Journal of Insect Science, 5: 1–5.

Haas A. (2007). “The phagosome: compartment with a license to kill”. Traffic, 8: 311–330.

Hack M.A. (1997). “The effects of mass and age on standard metabolic rate in house crickets”. *Physiological Entomology*, 22: 325–331.

Haine E.R., Rolff J. and Siva-Jothy M.T. (2006). “Functional consequences of blood clotting in insects”. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 456–464.

Hammond S.M., Caudy A.A. and Hannon G.J. (2001). “Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA.” *Nature Reviews Genetics*, 2(2): 110–119.

Harpur B.A. and Zayed A. (2013). “Accelerated Evolution of Innate Immunity Proteins in Social Insects: Adaptive Evolution or Relaxed Constraint?” *Molecular biology and evolution*, doi:10.1093.

Heimpel G.E. and de Boer J.G. (2008). "Sex determination in the hymenoptera". *Annual Review of Entomology*, 53: 209-230.

Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S. and Decourtye A. (2012). “A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees”. *ScienceExpress*, 336(6079): 348-350.

Hermosin I., Chicon R.M. and Cabezudo M.D. (2003). “Free amino acid composition and botanical origin of honey”. *Food Chemistry*, 83(2): 263–268.

Hetru C. and Hoffmann J.A. (2009). “NF- κ B in the Immune Response of *Drosophila*”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1: a000232.

Highfield A.C., El Nagar A., Mackinder L.C.M., Noe'l L.M.L.J., Hall M.J., Martin S.J. and Schroeder C. (2009). “Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses”. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 7212–7220.

Hoover S.E., Higo H.A. and Winston M.L. (2006). “Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition”. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 55–63.

Howard R.W. and Blomquist G.J. (2005). "Ecological, behavioral, and chemical aspects of insect hydrocarbons". *Annual Review of Entomology*, 50: 371-393.

Huang Z. (2010). "Honey bee nutrition". *American Bee Journal*, 150(8): 773-776.

Hunter W., Ellis J., Vanengelsdorp D., Hayes J., Westervelt D., Glick E., Williams M., Sela I., Maori E., Pettis, J., Cox-Foster D. and Paldi N. (2010). "Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, *Hymenoptera: Apidae*)". *PLoS pathogens*, 6(12): e1001160.

Ifantidis M. (1983). "Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells". *Journal of Apicultural Research*, 22(3): 200–206.

Ilyasov R.A., Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Poskryakov A.V. and Nikolaenko A.G. (2013). "Defensins in the Honeybee Antiinfectious Protection". *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(1): 1-9.

Irving P., Ubeda J.M., Doucet D., Troxler L., Lagueux M., Zachary D., Hoffmann J.A., Hetru C. and Meister M. (2005). "New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis". *Cellular Microbiology*, 7: 335-50.

Ishida T., Mizushima S., Azuma S., Kobayashi N., Tojo T., Suzuki K., Aizawa S., Watanabe T., Mosialos G., Kieff E., Yamamoto T. and Inoue J. (1996). "Identification of TRAF6, a novel tumor-necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region". *Journal of Biological Chemistry*, 271: 28745- 28748.

Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T. and Roe M.R. (2004). "Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*". *Crop Protection*, 23: 371–378.

Jeschke P., Nauen R., Schindler M. and Elbert A. (2011). "Overview of the status and global strategy for neonicotinoids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2897–2908.

- Jiang H., Wang Y., Ma C. and Kanost M.R.** (1997). "Subunit composition of pro-phenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit proPO-P1". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 835–850.
- Johnson R.M.** (2015). "Honey Bee Toxicology". *Annual review of entomology*, 60: 415–34.
- Kather R., Drijfhout F.P., Shemilt S. and Martin S.J.** (2015). "Evidence for Passive Chemical Camouflage in the Parasitic Mite *Varroa destructor*". *Journal of chemical ecology*, 41: 178–186.
- Kemp C. and Imler J.L.** (2009). "Antiviral immunity in *Drosophila*". *Current opinion in immunology*, 21: 3-9.
- Kessler S.C., Tiedeken E.J., Simcock K.L., Derveau S., Mitchell J., Softley S., Stout J.C. and Wright G.A.** (2015). "Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides". *Nature*, 521: 74–76.
- Kevan P.G.** (2007). "Bees, Biology and Management". Ontario, Canada: Enviroquest Ltd.
- Kim J.B., Han A.R., Park E.Y., Kim J.Y., Cho W., Lee J., Seo E.K. and Lee K.T.** (2007). "Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30: 2345–2351.
- Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. and Tscharntke T.** (2007). "Importance of pollinators in changing landscapes for world crops". *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 303–313.
- Kluser S. and Peduzzi P.** (2007). "Global Pollinator Decline: A Literature Review". UNEP/GRIDEurope.UNEP.
- Koch W. and Ritter W.** (1991). "Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*". *Journal of Veterinary Medicine*, 38: 337-344.

Krajewska M., Krajewski S., Zapata J.M., Van Arsdale T., Gascoyne R.D., Berern K., McFadden D., Shabaik A., Hugh, J., Reynolds A., Clevenger C.V. and Reed J.C.(1998). “TRAF4 expression in epithelial progenitor cells: analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues”. *American Journal of Pathology*, 152: 1549–1561.

Kralj J. and Fuchs S. (2006). “Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers”. *Apidologie*, 37(5): 577–587.

Kralj J., Brockmann A., Fuchs S. and Tautz J. (2007). “The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L.” *Journal of Comparative Physiology A*, 193(3): 363–370.

Kraus B. (1993). “Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L) of Different Ages”. *Journal of Apicultural Research*, 32(2): 57–64.

Kremen C., Williams N.M. and Thorp R.W. (2002). “Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16812– 16816.

Kroiss J., Schmitt T. and Strohm E. (2009). “Low level of cuticular hydrocarbons in a parasitoid of a solitary digger wasp and its potential for concealment”. *Entomological Science*, 12: 9–16.

Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G. and Given K. (2012). “Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields”. *PLoS ONE*, 7: e29268.

Kuster R.D., Boncristiani H.F. and Rueppell O. (2014). “Immunogene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae”. *Journal of Experimental Biology*, 217: 1710–1718.

Kwakman P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. and Zaat S.A.J. (2010). “How Honey Kills Bacteria”. *The FASEB Journal*, 24(7): 2576–2582.

Kylsten P., Kimbrell D.A., Daffre S., Samakovlis C. and Hultmark D. (1992). "The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands". MGG, 232: 335-343.

Lamprou I., Mamali I., Dallas K., Fertakis V., Lampropoulou M. and Marmaras V.J. (2007). "Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes". Immunology, 121(3): 314.

Lavine M.D. and Strand M.R. (2002). "Insect hemocytes and their role in immunity". Insect biochemistry and molecular biology, 32(10): 1295-1309.

Lee K.V., Steinhauer N., Rennich K., Wilson M.E., Tarpy D.R., Caron D.M., Rose R., Delaplane K.S., Baylis K., Lengerich E.J., Pettis J., Skinner J.A., Wilkes J.T., Sagili R. and van Engelsdorp D. (2015). "A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA". Apidologie, 46: 292–305.

Lemaitre B. and Hoffmann J. (2007). "The host defense of *Drosophila melanogaster*". Annual Review of Immunology, 25: 697-743.

Lemaitre B., Kromer-Metzger E., Michaut L., Nicolas E., Meister M., Georgel P., Reichhart J.M. and Hoffmann J.A. (1995). "A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92 (21): 9465-9469.

Leone P., Bischoff V., Kellenberger C., Hetru C., Royet J. and Roussel A. (2008). "Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan". Molecular Immunology, 45(9): 2521-30.

Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S., Ryu JH., Caroff M., Lee WJ., Mengin-Lecreulx D. and Lemaitre B. (2003). "The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition". Nature Immunology, 4(5): 478–484.

Li P., Yin Y.L., Li D., Kim S.W. and Wu G. (2007). "Amino acids and immune function". British Journal of Nutrition, 98(2): 237-252.

- Li W.F., Ma G.X. and Zhou X.X.** (2006). "Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action". *Peptides*, 27(9): 2350-2359.
- Lich J.D. and Ting J.P.** (2007). "CATERPILLER (NLR) family members as positive and negative regulators of inflammatory responses". *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4(3): 263–266.
- Ling E. and Yu X.Q.** (2005). "Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*". *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(12): 1356.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. and Sattler M.** (2005). "The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition". *EMBO Reports*, 6(12): 1149–1155.
- Lorenzi M.C. and Bagnères A.G.** (2002). "Concealing identity and mimicking hosts: a dual chemical strategy for a single social parasite? (*Polistes atrimandibularis*, *Hymenoptera: Vespidae*)". *Parasitology*, 125: 507– 512.
- Malone L.A., Giaccon H.A. and Newton M.R.** (1995). "Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis*". *Apidologie*, 26: 495–502.
- Manning R., Rutkay A., Eaton L. and Dell B.** (2007). "Lipid-enhanced pollen and lipid-reduced flour diets and their effect on the longevity of honey bees (*Apis mellifera* L.)". *Australian Journal of Entomology*, 46: 251–257.
- Mao W., Schuler M.A. and Berenbaum M.R.** (2013). "Honey constituents upregulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110: 8842–8846.
- Marinis J.M., Hutti J.E., Homer C.R., Cobb B.A., Cantley L.C., McDonald C. and Abbott D.W.** (2012). "IkappaB kinase alpha phosphorylation of TRAF4 downregulates innate immune signaling". *Molecular and Cellular Biology*, 32: 2479–2489.

- Marmaras V.J. and Lampropoulou M.** (2009). "Regulators and signalling in insect haemocyte immunity". *Cellular Signalling*, 21: 186–195.
- Marringa W.J., Krueger M.J., Burritt N.L. and Burritt J.B.** (2014). "Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry". *PLoS ONE*, 9(10): e108486. doi:10.1371/journal.pone.0108486.
- Martin S.J.** (1994). "Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud.in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions". *Experimental and Applied Acarology*, 18(2): 87–100.
- Martin S. J.** (2001). "The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: A modelling approach". *Journal of Applied Ecology*, 38: 1082–1093.
- Martin S.J. and Drijfhout F.P.** (2009). "A review of ant cuticular hydrocarbons". *Journal of chemical ecology*, 35: 1151–1161.
- Martin S.J., Highfield A.C., Brettell L., Villalobos E.M., Budge G.E., Powell M., Nikaido S. and Schroeder D.C.** (2012). "Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite". *Science*, 336(6086): 1304-1306.
- Martin S.J., Vitikainen E., Shemilt S., Drijfhout F.P. and Sundstrom L.** (2013). "Sources of variation in cuticular hydrocarbons in the ant *Formica exsecta*?" *Journal of Chemical Ecology*, 39:1415–1423.
- Martin-Hernandez R., Botias C., Barrios L., Martinez-Salvador A., Meana A., Mayack C. and Higes M.** (2011). "Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*)". *Parasitology research*, 109: 605-612.
- McDonnell C.M., Alaux C., Parrinello H, Desvignes JP., Crauser D., Durbesson E., Beslay D. and Le Conte Y.** (2013). "Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*)". *BMC Ecology*, 13: 25.
- Meister M. and Lagueux M.** (2003). "*Drosophila* blood cells". *Cellular microbiology*, 5: 573-580.

Meister M., Hetru C. and Hoffmann J.A. (2000). “The antimicrobial host defense of *Drosophila*”. Current Topics in Microbiology and Immunology, 248: 17-36.

Michel T., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. and Royet R. (2001). “*Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein”. Nature, 414(6865): 756–759

Milani N. and Nannelli R. (1988). “The tarsal sense organ in *Varroa jacobsoni* Oud.: SEM observations”. In: Proceedings of a Meeting of EC-Experts’ Group, Udine, Italy, pp. 71–82.

Möckel N., Gisder S. and Genersch E. (2011). “Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route”. Journal of General Virology, 92: 370-377.

Mongiardino Kock. N., Hasson E. and Soto I.M. (2012). “Differences in wing melanization and pigmentation pattern in *Drosophila buzzatii* (Diptera: Drosophilidae) under chemical stress”. Review of Society of Entomology, 71 (1-2): 87-97.

Moita L.F., Vriend G., Mahairaki V., Louis C. and Kafatos F.C. (2006). “Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new β integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. Coli*”. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36(4): 282.

Moritz R. F. A., de Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Nuemann P. and Paxton R. J. (2010). “Research strategies to improve honeybee health in Europe”. Apidologie 41: 227-242.

Nappi A.J. and Ottaviani E. (2000). “Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates”. BioEssays, 22: 469-480.

Nappi A.J., Vass E., Frey F. and Carton Y. (1995). “Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites”. European Journal of Cell Biology, 68: 450-56.

Nazzi F. and Le Conte Y. (2016). “Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*”. Annual review of entomology, 61: 417–32.

Nazzi F. and Pennacchio F. (2014). “Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem”. *Trends in parasitology*, 30(12): 556–561.

Nazzi F., Annoscia D., Caprio E., Di Prisco G. and Pennacchio F. (2014). “Honeybee immunity and colony losses”. *Entomologia*, 2: 203.

Nazzi F., Bortolomeazzi R., della Vedova G., del Piccolo F., Annoscia D. and Milani N. (2009). “Octanoic acid confers to royal jelly *Varroa*-repellent properties”. *Naturwissenschaften*, 96: 309–314.

Nazzi F., Brown SP., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E. and Pennacchio F. (2012). “Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies”. *PLoS Pathogens* 8(6): e1002735. doi:10.1371/journal.ppat.1002735.

Nazzi F., Milani N. and della Vedova G. (2004). “A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells”. *Apidologie*, 35: 403–410.

Neumann P. and Carreck N. L. (2010). “Honey bee colony losses”. *Journal of Apicultural Research*, 49: 1-6.

Nicolson S.W. and Human H. (2008). “Bees get a head start on honey production”. *Biology letters*, 4: 299–301.

Niu J., Meeus I., Cappelle K., Piot N. and Smagghe G. (2014). “The immune response of the small interfering RNA pathway in the defense against bee viruses”. *Current Opinion in Insect Science*, 6: 22-27.

Ochsenbein A.F. and Zinkernagel R.M. (2000). “Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. Review”. *Immunology Today*, 21(12): 624-630.

Oerke E.C. and Dehne H.W. (2004). “Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection”. *Crop protection*, 23: 275–285.

Oldroyd B.P. (2007).” What’s killing American honeybees? *PLoS Biology*, 5: e168.

- Oliver R.** (2010). "The economy of the hive, part 1". *American Bee Journal*, 150(1): 68-70.
- Omholt S.W. and Amdam G.V.** (2004). "Epigenetic regulation of aging in honeybee workers". *Science of Aging Knowledge Environment*, 28.
- Ottaviani E.** (2005). "Insect immunorecognition". *ISJ*, 2: 142-151.
- Oudemans A.C.** (1904). "On a new genus and species of parasitic acari". *Notes from the Leyden Museum*, 24: 216–222.
- Ozdemir H.H., Kara M., Yumrutas O., Uckardes F., Eraslan E., Demir C.F. and Bal R.** (2014). "Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models". *Cognitive Neurodynamics*, 8: 411–416.
- Pakpour N., Corby-Harris V., Green G.P., Smithers H.M., Cheung K.W., Riehle M.A. and Luckhart S.** (2012). "Ingested human insulin inhibits the mosquito NF- κ B-dependent immune response to *Plasmodium falciparum*". *Infection and Immunity*, 80: 2141–2149.
- Palmer M.J., Moffat C., Saranzewa N., Harvey J., Wright G.A. and Connolly C.N.** (2013). "Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees". *Nature Communications*, 4: 1634.
- Parker J.S., Mizuguchi K. and Gay N.J.** (2001). "A family of proteins related to Spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome". *Proteins*, 45: 71–80.
- Pennacchio F. and Strand M.R.** (2006). "Evolution of Developmental Strategies in Parasitic *Hymenoptera*". *Annual Review of Entomology*, 51: 233-258.
- Pereira-Neves A. and Benchimol M.** (2007). "Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights". *Biology of the Cell*, 99: 87-101.
- Pernal S. and Currie R.** (2000). "Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.)". *Apidologie*, 31: 387–409.

- Pettis J.S., vanEngelsdorp D., Johnson J. and Dively G.** (2012). “Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*”. *Naturwissenschaften*, 99(2): 153-8.
- Pirk C.W.W., Boodhoo C., Human H. and Nicolson S.** (2010). “The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*)”. *Apidologie*, 41(1): 62–72.
- Ponton F., Wilson K., Holmes A.J., Cotter S.C., Raubenheimer D. and Simpson S.J.** (2013). “Integrating nutrition and immunology: A new frontier”. *Journal of Insect Physiology*, 59(2): 130-137.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. and Kunin W.E.** (2010). “Global pollinator declines: trends, impacts and drivers”. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 345–353.
- Qu N., Jiang J., Sun L., Lai C., Sun L. and Wu X.** (2008). “Proteomic Characterization of Royal Jelly Proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*), European (*Apis mellifera*) Honeybees”. *Biochemistry*, 1: 1-12.
- Ramet M., Manfruelli P., Pearson A., Mathey-Prevot B. and Ezekowitz R.A.** (2002). “Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. Coli*”. *Nature*, 416: 644-648.
- Rath W.** (1999). “Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud”. *Apidologie*, 30: 97–110.
- Ratnieks F.L.W. and Carreck N.L.** (2010). “Clarity on honey bee collapse?” *Science*, 327: 152-153.
- Raubenheimer D. and Simpson S.J.** (1997). “Integrative models of nutrient balancing: application to insects and vertebrates”. *Nutrition research reviews*, 10: 151–179.
- Reddien P.W. and Horvitz H.R.** (2004). “The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 193-221.

Ribière M., Ball B.V. and Aubert M. (2008). “Natural history and geographic distribution of honey bee viruses”. In: Aubert M., Ball B.V., Fries I., Moritz R.F.A., Milani N., Bernardinelli I. (Eds); Virology and the honey bee. European Communities, Luxembourg, pp. 15–84.

Richard F.J., Aubert A. and Grozinger C.M. (2008). “Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers”. BMC Biology, 6:50.doi:10.1186/1741-7007-6-50.

Richard F.J., Holt H.L. and Grozinger C.M. (2012). “Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*)”. BMC genomics, 13(1): 558.

Rinderer T.E. and Elliott K.D. (1977). “Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet”. Journal of Economic Entomology, 70: 431–433.

Rinderer T.E., Rothenbuhler W.C. and Gschnauer T.A. (1974). “The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus larvae*”. Journal of Invertebrate Pathology, 23: 347–350.

Ritsick D.R., Edens W.A., McCoy J.W. and Lambeth J.D. (2004). “The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes”. The Biochemical Society, 71: 85–96.

Rortais A., Arnold G., Halm M. P. and Touffet-Briens F. (2005). “Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees”. Apidologie, 36: 71–83.

Rosetto M., Manetti A.G.O., Giordano P.C., Marri L., Amons R., Baldari C.T., Marchini D. and Dallai R. (1996). “Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*”. European Journal of Biochemistry, 241: 330-337.

Rothenbuhler W. (1964). "Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood". *American Zoologist*, 4: 111–123.

Royet J., Reichhart J.M. and Hoffmann J.A. (2005). "Sensing and signaling during infection in *Drosophila*". *Current opinion in immunology*, 17: 11–17.

Runckel C., Flenniken M.L., Enge J.C., Ruby J.G., Ganem D., Andino R. and DeRisi J.L. (2011). "Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*". *PloS one*, 6(6): e20656.

Ruvolo M. and Landim C. (1993). "Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 387-395.

Ryabov E.V., Wood G.R., Fannon J.M., Moore J.D., Bull J.C., Chandler D., Mead A., Burroughs N. and Evans D.J. (2014). "A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or *in vitro*, transmission". *PLoS pathogens*, 10(6): e1004230.

Sammataro D. and Avitabile A. (1998). "The Beekeeper's Handbook". Ithaca, New York: Cornell University Press.

Sammataro D., Gerson U. and Needham G. (2000). "Parasitic mites of honey bee: life history, implications, and impact". *Annual Review of Entomology*, 45: 519–548.

Sass M., Kiss A. and Locke M. (1994). "Integument and hemocyte peptides". *Journal of insect physiology*, 40: 407–421.

Schleifer KH and Kandler O. (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications". *Bacteriological reviews*, 36(4): 407–477.

Schluns H. and Crozier R.H. (2007). "Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference". *Insect Molecular Biology*, 16: 753–759.

- Schmehl D.R., Teal P.E., Frazier J.L. and Grozinger C.M.** (2014). “Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 71: 177-190.
- Schmickl T. and Crailsheim K.** (2002). “How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions.” *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51: 415–425.
- Schulz A. E.** (1984). “Reproduction and population dynamics of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud.in correlation with the brood cycle of *Apis mellifera*”. *Apidologie*, 5: 401-419.
- Seeley T.D. and Visscher P.K.** (1985). “Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction”. *Ecological Entomology*, 10: 81–88.
- Siede R. and Buchler R.** (2003). “Symptomatic *Black Queen Cell Virus* Infection of drone brood on hessian bee yards”. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 116: 130-133.
- Simone-Finstrom M. and Spivak M.** (2010). “Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees”. *Apidologie*, 41: 295-311.
- Simpson S. J. and Raubenheimer D.** (2012). “The Nature of Nutrition: A Unifying Framework from Animal Adaptation to Human Obesity”. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Siva-Jothy M.T. and Thompson J.J.W.** (2002). “Short-term nutrient deprivation affects immune function”. *Physiological Entomology*, 27: 206–212.
- Siva-Jothy M.T., Moret Y. and Rolff J.** (2005). “Insect immunity: an evolutionary ecology perspective”. *Advances in Insect Physiology*, 32: 1–48.
- Soderhall K. and Cerenius L.** (1998). “Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity”. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23–28.

Spivak M. and Gilliam M. (1998). “Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*”. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World*, 79: 124–134.

Spivak M. and Reuter G.S. (2001). “Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior”. *Apidologie*, 32: 555–565.

Spleen A.M., Lengerich E.J., Rennich K., Caron D., Rose R., Pettis J.S., Henson M., Wilkes J.T., Wilson M., Stitzinger J., Lee K., Andree M., Snyder R. and vanEngelsdorp D. (2013). “A national survey of managed honey bee 2011–12 winter colony losses in the United States: results from the Bee Informed Partnership”. *Journal of Apicultural Research*, 52(2): 44-53.

Starks P.T., Blackie C.A., Thomas D. and Seeley P.T. (2000). “Fever in honeybee colonies”. *Naturwissenschaften*, 87: 229–231.

Steinhauer N.A., Rennich K., Wilson M.E., Caron D.M., Lengerich E.J., Pettis J.S., Rose R., Skinner J.A., Tarpy D.R., Wilkes J.T. and vanEngelsdorp D. (2014). “A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership 2012–2013”. *Journal of Apicultural Research*, 53(1): 1–18.

Stoepler T.M., Castillo J.C., Lill J.T. and Eleftherianos I. (2013). “Hemocyte Density Increases with Developmental Stage in an Immune-Challenged Forest Caterpillar”. *PlosOne*, 8: e70978.

Strand M.R. (2008). “The insect cellular immune response”. *Insect Science*, 15: 1-14.

Stuart L.M. and Ezekowitz R.A. (2008). “Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly”. *Nature reviews*, 8: 131-141.

Sun H., Bristow B.N., Qu G. and Wasserman S.A. (2002). “A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling”. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 12871–12876.

Szymas B. and Jedruszuk A. (2003). “The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*”. *Apidologie*, 34: 97–102.

Takehana A., Katsuyama T., Yano T., Oshima Y., Takada H., Aigaki T. and Kurata S. (2002). “Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae”. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99(21): 13705–13710.

Tang H. (2009). “Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*”. Fly, 3: 105.

Tautz J. (2008). “The buzz about bees: Biology of a superorganism”. Springer: Berlin, Germany.

Tentcheva D., Gauthier L., Bagny L., Fievet J., Dainat B., Cousserans F., Colin M. E. and Bergoin M. (2006). “Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*”. Apidologie, 37(1): 41.

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C. and Schmidt O.(2002). “The coagulation of insect hemolymph”. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 59: 363–72.

Theopold U., Schmidt O., Soderhall K. and Dushay M.S. (2004). “Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing”. Trends in immunology, 25: 289–94.

Tomizawa M. and Casida J.E. (2003). “Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors”. Annual review of entomology, 48: 339–364.

Trudeau D., Washburn J.O. and Volkman L.E. (2001). “Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. Journal of Virology, 75: 996–1003.

Tsakas S. and Marmaras VJ. (2010). “Insect immunity and its signalling: an overview”. ISJ, 7: 228-238.

Turillazzi S., Sledge M.F., Dapporto L., Landi M., Fanelli D., Fondelli L., Zanetti P. and Dani F. (2004). “Epicuticular lipids and fertility in primitively

social wasps (*Hymenoptera Stenogastrinae*)". *Physiological Entomology*, 29: 464–471.

Van der Sluijs J.P., Simon-Delso N., Goulson D., Maxim L., Bonmatin J.M. and Belzunces L.P. (2013). "Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services". *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5: 1–13.

van der Zee R., Brodschneider R., Brusbardis V., Charrière J.D., Chlebo R., Coffey M.F., Dahle B., Drazic M.M., Kauko L., Kretavicius J., Kristiansen P., Mutinelli F., Otten C., Peterson M., Raudmets A., Santrac V., Seppälä A., Soroker V., Topolska G., Vejsnæs F. and Gray A. (2014). "Results of international standardized beekeeper surveys of colony losses for winter 2012–2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modeling of risk factors for winter loss". *Journal of Apicultural Research*, 53: 19–34.

van der Zee R., Gray A., Holzmann C., Pisa L., Brodschneider R., Chlebo R., Coffey M.F., Kence A., Kristiansen P., Mutinelli F., Nguyen B.K., Nouredine A., Peterson M., Soroker V., Topolska G., Vejsnæs F. and Wilkins S. (2013). "Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*". *Journal of Apicultural Research*, 52(4): 1-32.

van Dooremalen C., Stam E., Gerritsen L., Cornelissen B., van der Steen J., van Langevelde F. and Blacquiere T. (2013). "Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees". *Journal of Insect Physiology*, 59: 487-493.

vanEngelsdorp D. and Meixner M.D. (2010). "A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them". *Journal of invertebrate pathology*, 103: S80–S95.

VanEngelsdorp D., Caron D., Hayes J., Underwood R., Henson M., Rennich K., Spleen A., Andree M., Snyder R., Lee K., Roccasecca K., Wilson M., Wilkes J., Lengerich E. and Pettis J.S. (2012). "A national survey of managed honey bee 2010-11 winter colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership". *Journal of Apicultural Research*, 51(1): 115–124.

vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpy D.R. and Pettis J.S. (2009). “Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study”. PloS ONE, 4: e6481.

vanEngelsdorp D., Underwood R., Caron D. and Hayes J.Jr (2007). “An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America”. American Bee Journal, 147: 599–603.

Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigùès B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P. and Delbac F. (2011). “Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*”. PloS ONE, 6: e21550.

Villalobos E.M. (2016). “The mite that jumped, the bee that traveled, the disease that followed”. Science, 351(6273): 554-6.

Vilmos P. and va Kurucz E. (1998). “Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system”. Immunology Letters, 62: 59–66

Vincent J.F.V. and Wegst.U.G.K. (2004). “Design and mechanical properties of insect cuticle”. Arthropod Structure and Development, 33: 187–199.

Wang L., Weber A.N., Atilano M.L., Filipe S.R., Gay N.J. and Ligoxygakis P. (2006). “Sensing of Gram-positive bacteria in *Drosophila*: GGBP1 is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA”. The EMBO Journal, 25: 5005–5014.

Werren J.H., Richards S., Desjardins C.A., Niehuis O., Gadau J., Colbourne J.K. (2010). “Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species”. Science, 327: 343–348.

Wheeler M.M. and Robinson G.E. (2014). “Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup”. Scientific reports, 4: 5726.

White G.F. (1917). “Sacbrood”. US Department of Agriculture Bulletin No 431.

Wieggers F.P. (1986). “Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud”. European research on varroatosis control.

Wille H., Wille M., Kilchenmann V., Imdorf A. and Bühlmann G. (1985). “Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren”. *Revue suisse de Zoologie*, 92: 897–914.

Wilson K., Thomas M.B., Blanford S., Doggett M., Simpson S.J. and Moore S.L. (2002). “Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 99: 5471–5475.

Wilson-Rich N., Dres S.T. and Starks P.T. (2008). “The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*)”. *Journal of Insect Physiology*, 54: 1392–1399.

Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H. and Starks P.T. (2009). “Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies”. *Annual Review of Entomology*, 59: doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.

Winfree R. G. (2011). “Valuing pollination services to agriculture”. *Ecological Economics*, 80- 88.

Winston M.L. (1991). “The Biology of the Honey Bee”. Harvard University Press. USA.

Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I. and Diederichs S. (2009). “Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation”. *Nature Cell biology*, 11: 228-234.

Wojda I., Kowalski P. and Jakubowicz T. (2004). “JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*”. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 56: 143–154.

Xie P. (2013). “TRAF molecules in cell signaling and in human diseases”. *Journal of Molecular Signaling*, 8: 7.

Yang D., Biragyn A., Hoover D.M., Lubkowski J. and Oppenheim J.J. (2004). “Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense II” *Annual Review of Immunology*, 22: 181–215.

Yang X. and Cox-Foster D.L. (2005). “Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification”. *Proceeding of National Academy of Science of United States of America*, 102(21): 7470–7475.

Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D. and Yu X.Q. (2014). “Insect antimicrobial peptides and their applications”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 5807-5822.

Yue C. and Genersch E. (2005). “RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*)”. *Journal of General Virology*, 86: 3419–3424.

Yue C., Schroder M., Bienefeld K. and Genersch E. (2006). “Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones”. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 105-108.

Yutin N., Wolf M.Y., Wolf Y.I. and Koonin E.V. (2009). “The origins of phagocytosis and eukaryogenesis”. *Biology Direct*, 4: 9.

Zhou L., Hashimi H., Schwartz L.M. and Nambu J.R. (1995). “Programmed cell death in the *Drosophila* central nervous system midline”. *Current biology*, 5: 784–790.

Zhou R., Silverman N., Hong M., Liao D.S., Chung Y., Chen Z.J., Maniatis T. (2005). “The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity”. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 34048–34055.

RINGRAZIAMENTI

Circa tre anni fa iniziavo il percorso che si conclude con la scrittura di questo lavoro di tesi. Ora con piacere riservo una pagina per ringraziare le persone che mi hanno accompagnato, in modi diversi, in questa bella esperienza. Un doveroso ringraziamento lo devo quindi al Prof. Francesco Pennacchio, per il quale provo una sincera e viva stima intellettuale, che mi ha dato l'opportunità di lavorare nel suo laboratorio e di svolgere un periodo di studi negli Stati Uniti. Nella breve ma interessante avventura americana ho avuto modo di conoscere persone brillanti come il Prof. Gene E. Robinson e la Dott.ssa Amy Cash Ahmed. A loro e a tutti i ragazzi del laboratorio Robinson va un sincero ringraziamento per avermi accolto con calore ed aiutato nella parentesi americana. Prima di arrivare in un laboratorio americano ho però potuto lavorare in laboratorio tutto italiano con persone altrettanto professionali, competenti e pazienti come la Dott.ssa Silvia Caccia, il Dott. Gennaro Di Prisco e la Dott.ssa Paola Varricchio che voglio ringraziare per aver arricchito la mia esperienza con le loro indicazioni. Un grande grazie lo dedico a tutto il team del laboratorio Tremblay e in particolare al Dott. Bruno Espinosa. Ricordo poi con affetto tutti i colleghi di laboratorio di ieri e di oggi a cui auguro il meglio e con cui spero vivamente di poter restare sempre in contatto. Un grazie lo rivolgo anche al Dott. Emilio Caprio, alla Dott.ssa Silvia Gigliotti, alla Prof.ssa Rosanna Capparelli e al Dott. Marco Iannaccone che mi hanno supportato in modi diversi in questo lavoro di tesi.

La mia esperienza nel laboratorio ha avuto tanti altri momenti di contorno. In tutti questi ho potuto contare sulla presenza di Emanuela, Giovanna, Angela e Felice, preziosi amici di sempre.

Un ringraziamento speciale lo devo alla mia famiglia. A mia madre, mio padre, a Felice e Angela dico grazie per il vostro amore incondizionato che è alla base di tutto che sono e faccio.

